



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida



Université Saad
Dahlab-Blida 1-

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires
d'origine animale : Etude bibliographique**

Présenté par

MEHDID Zahia et HATHAT Nabila

Soutenu le 30/06/2020

Devant le jury :

Présidente :	SAHRAOUI N	PR	ISV de Blida
Examinatrice :	TARZAALI D	MAA	ISV de Blida
Promotrice :	BOUKERT R	MAA	ISV de Blida

Année : 2019-2020

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à notre promotrice **M^{me} BOUKERT Razika**, maître assistante A à l'institut des sciences vétérinaires de l'université de Blida 1, qui a accepté de diriger ce mémoire.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à Pr **SAHRAOUI Naima**, Professeur à l'institut des sciences vétérinaires de l'université de Blida 1, d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.

Nous tenons à remercier M^{elle} **TARZAALI Dalila**, maître assistante A à l'institut des sciences vétérinaires de l'université de Blida 1, d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner notre ce travail.

Nous tenons par ailleurs à exprimer notre très haute considération au personnel de l'institut des sciences vétérinaires et la station expérimentale de l'université de Blida 1.

Et enfin, par crainte d'oublier de nommer certaines personnes, nous adressons nos sincères gratitude à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à :

A ma très chère mère **Om El Khir**, quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai peine de remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, la bienveillance me guide et la présence à mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père **Ali**, tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A l'homme de ma vie, mon exemple d'éternel. Mon soutien moral et source de joie et bonheur, à celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir. Qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et amour. Que dieu te garde pour moi **Radouane**.

A mes très chers frères et sœurs et à toute ma famille chacun son nom, pour leurs soutiens aux moments les plus difficiles. Que dieu vous garde et illumine vos chemins.

A ceux que j'aime beaucoup, qui m'ont toujours soutenus et étaient toujours à mes cotés, à tous mes amis sans exception.

Je termine avec la personne qui a partagé tous le travail, qui a supporté mon humeur au moment de stress. Mon binôme **Zahia**.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Nabila

DEDICACE

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à :

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **Boualem**.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **Zoubida**.

A mes chers sœurs et frères, que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mes adorables petites sœurs **Chaima** et **Hidaya**, qui savent toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A mon petit ange, ma nièce **Nihad**.

A mes ancies et tantes, que dieu leurs donne une longue et joyeuse vie.

A tout les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant, merci pour votre amours et votre encouragement.

Sans oublier mon binôme **Nabila** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout le long de ce projet.

ZAHIA

Résumé

Les Antibiotiques ont une place importante dans l'élevage moderne, leur utilisation pour protéger la santé de l'animal et perfectionner sa production, conduit à leur présence sous forme de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale.

La présente étude a été réalisée dans le but d'actualiser les données bibliographiques existantes sur la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origines.

Notre travail s'articule autour de trois grands chapitres. Le premier expose une revue de généralités sur les antibiotiques, le deuxième sur les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animales, et le dernier chapitre s'intéresse sur les méthodes de détection des résidus d'antibiotiques.

En conclusion, il apparait donc clairement que l'utilisation des antibiotiques en santé et en alimentation animale doit être étroitement surveillée par la mise en place d'un plan national de contrôle rigoureux pour la recherche des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale au sein des fermes, des usines et des points de ventes afin de rassurer la sécurité du consommateur.

Mots clés : Antibiotique, Résidus, denrées alimentaires, animal.

ملخص

للمضادات الحيوية مكانة مهمة في تربية الحيوانات الحديث، واستخدامها لحماية صحة الحيوان وتحسين إنتاجه، يؤدي إلى وجودها في شكل بقايا في المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني. أجريت هذه الدراسة بهدف تحديث الأدبيات الموجودة حول وجود بقايا المضادات الحيوية في المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني.

ينقسم عملنا إلى ثلاثة فصول رئيسية. يقدم الأول مراجعة للمعلومات العامة عن المضادات الحيوية، والثاني عن بقايا المضادات الحيوية في المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني، ويركز الفصل الأخير على طرق الكشف عن بقايا المضادات الحيوية. وخلص إلى أنه يجب مراقبة استخدام المضادات الحيوية في صحة الحيوان والأعلاف عن كثب من خلال وضع خطة رقابة وطنية صارمة للكشف عن بقايا المضادات الحيوية في المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني في المزارع والمصانع وفي نقاط البيع من أجل طمأننة سلامة المستهلك.

الكلمات الرئيسية: مضاد حيوي، بقايا، طعام؛ حيوان

Abstract

Antibiotics have an important place in modern animal husbandry, their use to protect the health of the animal and improve its production, leads to their presence in the form of residues in foodstuffs of animal origin.

The present study was carried out with the aim of updating the existing literature on the presence of antibiotic residues in foodstuffs of animal origin.

Our work is divided into three main chapters. The first provides a review of general information on antibiotics, the second on antibiotic residues in foodstuffs of animal origin, and the final chapter focuses on methods for detecting antibiotic residues.

It is concluded that the use of antibiotics in animal health and feeding stuffs must be closely monitored by the establishment of a rigorous national control plan for the detection of antibiotic residues in foodstuffs of animal origin on farms, in factories and at points of sale in order to reassure consumer safety.

Keywords : Antibiotic, Residues, food; animal.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES	2
1.1. Définition	2
1.2. Utilisation en élevage animal	2
1.3. Classification et mode d'action des antibiotiques	2
1.3.1. Bêta-lactamines	3
1.3.2. Tétracyclines	3
1.3.2.1. Cyclines naturelles	3
1.3.2.2. Cyclines semi-synthétiques	3
1.3.3. Aminosides	4
1.3.4. Macrolides	4
1.3.5. Quinolones	4
1.3.6. Sulfamides	5
1.3.7. Antibiotiques polypeptidiques	5
1.4. Associations d'antibiotiques	6
1.5. Mécanismes d'action des antibiotiques	7
1.5.1. Activité antibactérienne	8
1.5.2. Activité bactériostatique	8
1.5.3. Activité bactéricide	8
1.5.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	8
1.5.5. Concentration minimale bactéricide (CMB)	8
1.6. Facteurs de variation des paramètres pharmacocinétiques	8
1.6.1. Facteurs liés au médicament	9
1.6.2. Facteurs liés au mode et à la voie d'administration	9
1.6.2.1. Administration intraveineuse	9
1.6.2.2. Administration intramusculaire et sous cutané	9
1.6.2.3. Administration orale	9
1.6.2.4. Administration intra mammaire	9
1.6.3. Facteurs liés à l'animal	9

1.7. Pharmacocinétique des antibiotiques	10
1.7.1. Absorption	10
1.7.1.1. Absorption digestive	10
1.7.1.2. Absorption parentérale	10
1.7.2. Distribution	10
1.7.3. Biotransformation	11
1.7.4. Elimination	11
Chapitre 2 : Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animales	12
2.1. Définition	12
2.2. Origine des résidus des médicaments vétérinaires	12
2.3. Utilisation des antibiotiques	12
2.3.1. Utilisation des antibiotiques à titre thérapeutique curatif ou en antibio-prévention	14
2.3.2. Utilisation en métaphylaxie	14
2.3.3. Utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires	14
2.3.4. Conséquences négatives de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux	15
2.3.5. Conséquences liées à la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires	15
2.3.5.1. Limite maximale résiduelle (LMR)	15
2.3.5.2. Délai d'attente	16
2.3.5.3. Lien entre temps d'attente et LMR	17
2.4. Nature des résidus	17
2.4.1. Résidus extractibles	17
2.4.2. Résidus non-extractibles	17
2.4.3. Niveau des résidus	18
2.5. Propriétés des résidus	18
2.5.1. Notion de biodisponibilité et de biodisponibilité de relais	18
2.5.2. Notion de toxico disponibilité	19
2.6. Dangers liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale	19
2.6.1. Toxicité directe des résidus d'antibiotiques	20
2.6.2. Risque allergique	20
2.6.3. Risques cancérigènes	20
2.6.4. Risque bactériologique	21

2.6.4.1. Sélection de souches bactériennes résistantes	21
2.6.4.2. Modification de la microflore intestinale	21
Chapitre 3 : METHODES DE DETECTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES	23
3.1. Introduction	23
3.2. Méthodes de dépistage	23
3.2.1. Principe des méthodes de dépistage	23
3.2.2. Description des méthodes de dépistage	23
3.2.3. Méthodes microbiologiques	25
3.2.3.1. Méthodes des quatre boîtes	25
3.2.3.2. Test d'acidification	26
3.2.3.3. Méthode de diffusion sur gélose	27
3.2.4. Les méthodes physico-chimiques	27
3.2.4.1. Méthodes enzymatiques	28
3.2.4.2. Méthodes immunologiques	28
3.2.4.2.1. Méthodes radio immunologiques (RIA)	29
3.2.4.2.2. Test ELISA	30
3.2.4.3. Méthodes chromatographiques	30
3.2.4.3.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	31
3.2.4.3.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	32
3.3. Méthodes de confirmation	33
CONCLUSION	35
RECOMMANDATIONS	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Familles d'antibiotiques	6
Tableau 2 : Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine	13
Tableau 3 : Délai d'attente de quelques antibiotiques	16
Tableau 4 : Comparaison entre les méthodes bactériennes et les méthodes physico-chimiques et immunologiques pour la recherche des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaire d'origine animal	24
Tableau 5 : Présentation de la méthode des quatre boites utilisé pour le contrôle officiel	26
Tableau 6 : Analyse de laboratoire pratique dans le contrôle des résidus d'antibiotiques	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Principaux sites d'action des antibiotiques	7
Figure 2: Méthodes des quatre boites	25
Figure 3: Principe du test d'acidification	27
Figure 4: Equation de base des dosages immuno-chimiques par compétition	29
Figure 5: Schéma de principe de RIA et RRA	29
Figure 6 Principe d'une chromatographie	31

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- APCI** : Atmospheric Pressure Chemical Ionization
- ATB** : antibiotiques
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- CC β** : Capacité de détection
- CMB** : Concentration minimale bactéricide
- DES** : Dose sans effet
- DGAI** : Direction Générale de l'Alimentation
- DJA** : Dose journalière admissible
- ELISA** : Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay
- FDA** : Food and Drug Administration
- HPLC** : Chromatographie liquide haute performance
- LMR** : Limite maximale résiduelles
- MRL** : Maximum Residue Limits
- PPb** : Partie par billion
- PPM** : Partie par un million
- PPT** : Partie par trillion
- RIA** : Méthodes radio-immunologique
- SM** : Spectrométrie de masse
- TA** : Temps d'attente.

INTRODUCTION

En Algérie, l'utilisation curative et préventive des antibiotiques en élevage des animaux de rente n'est pas réglementée. Ainsi, le contrôle de la limite Maximale de Résidus d'antibiotiques (LMR) dans les denrées alimentaires animales ou d'origine animale n'est pas appliqué, ce qui présente un risque certain pour le consommateur algérien sachant que ces résidus peuvent avoir **des** conséquences néfastes potentielles sur sa santé (**Zeghilet . 2009**).

Les résidus d'antibiotiques dans le lait doivent être une source de préoccupation des pouvoirs publics, surtout lorsqu'on connaît leurs effets néfastes sur la santé humaine (antibiorésistance, problèmes allergiques, etc.), sur la technologie laitière (pertes économiques) (**Cauty et Pureau ; 2003**).

Leur nécessité dans l'arsenal thérapeutique et leur utilité économique est cependant indéniable. Il convient donc de s'interroger sur les risques qu'encourent les consommateurs liés à leur utilisation chez les animaux producteurs de denrées alimentaires, c'est-à-dire sur les risques liés à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale pour les consommateurs mais aussi pour l'Industrie agro-alimentaire (**Stoltz, 2008**).

Ainsi, quelle que soit la nature de l'antibiotique administré, le risque de retrouver des résidus dans les tissus (viandes) et les produits d'excrétion (lait, œufs) est présent. C'est pour cette raison qu'il a été fixé pour chaque médicament un seuil au-delà duquel la quantité de résidus présents dans un aliment présente un danger direct pour le consommateur.

Ce travail s'attache à présenter ce que sont les antibiotiques, les résidus d'antibiotiques, les dangers de leur présence dans les denrées alimentaires et surtout la gestion de ce risque par l'Etat afin de garantir aux consommateurs des denrées alimentaires saines.

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES

1.1. Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par des micro-organismes (champignons microscopique et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber spécifiquement la vitalité d'autre micro-organisme par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe **(Gauthier, 2001)**.

Selon Bourin et *al.* **(1994)** ; les antibiotiques sont définis par leur :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité),
- Toxicité sélective (mode d'action),
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

1.2. Utilisation en élevage animal

Les antibiotiques sont utilisés en médecine vétérinaire et en agriculture depuis plus de 40 ans. Leur emploi a permis d'atteindre un triple objectif: accroître l'efficacité de la production, procurer aux consommateurs une source de protéines d'excellente qualité à un prix plus abordable et, finalement, d'améliorer la santé des animaux. L'utilisation d'antibiotiques en élevage a deux objectifs: thérapeutique ou zootechnique **(Scippo, 2008)**.

1.3. Classification et mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés dans des familles et parfois des groupes dans lesquels les représentants possèdent des caractères voisins ou identiques: la nature chimique et l'origine, le spectre d'action, le mécanisme d'action, les mécanismes de résistance et les effets secondaires **(Larpent et Sanglier, 1989)**.

Les principales familles d'antibiotiques actuellement utilisées en thérapeutique sont:

- Les bêtalactamines (pénicillines et céphalosporines);
- Les aminosides (streptomycine, néomycine, gentamycine);
- Les antibiotiques polypeptidiques (colistine, Bacitracine);
- Les tétracyclines (oxytétracycline, tétracycline);
- Les macrolides (Tylosine, Erythromycine).

Ainsi que les principaux antibactériens de synthèse qui sont :

- Les sulfamides (Sulfaguanidine);
- Les quinolones (Flumiquine).

1.3.1. Bêta-lactamines

Selon Puyt (2002), les bêtalactamines représentent les antibiotiques les plus actifs et les moins toxiques. En fonction de leur origine et de leur structure, deux groupes d'importance inégale sont à distinguer :

-Les pénicillines, produites par des moisissures du genre *pénicillium*.

-Les Céphalosporines, d'importance moindre en médecine vétérinaire de genre *céphalosporinium*.

Le noyau de base est le cycle β lactame. Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides. Ils se répartissent en trois groupes :

- Groupe I : Il comporte le cycle β lactame et un cycle thiazoline (ex: spectre étroits peni M et peni V),
- Groupe II : Il comporte un cycle lactame et un cycle dihydrothiazine (ex: spectres larges peni A),
- Groupe III : Il comporte un noyau limité au cycle β lactame (ex : céphalosporines).

❖ Mécanisme d'action

Les β -lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne (Born et al., 1994).

1.3.2. Tétracyclines

Les tétracyclines sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité.

Selon Bourin et al. (1994), il y a les cyclines naturelles et les cyclines semi synthétiques.

➤ Cyclines naturelles

- Chlorotétracycline (Auréomycine).
- Tétracycline base (Tetracyne).

➤ Cyclines semi-synthétiques

- Oxytétracycline (Terramycine).
- Doxycycline (Vibramycine).

La Doxycycline et la Mincycline ont une meilleure activité in vitro et sont actives sur les souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles. Elles ont, de plus, une meilleure absorption digestive et une plus longue durée d'action).

❖ Spectre d'activité

C'est avec les tétracyclines qu'est apparu le terme "à très large spectre".

Les tétracyclines sont indiquées pour le traitement des *pasteurelloses*, *brucelloses*, *Chamydioses*, *Coxiellses*, *Rickettsioses*, *Mycoplasmes*, *Spirochètes*, *Leptospira* et *Borrelia*.

Ils ont une bonne activité, pour la majorité des bacilles à Gram positif aérobies et anaérobies sporulés. Cependant, la sensibilité in vitro doit être vérifiée.

Elles sont actives sur *Plasmodium falciparum* avec un effet synergique avec la quinine (Chataigner, 2004).

❖ Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des tétracyclines réside dans l'inhibition des synthèses protéiques. De nombreuses épreuves expérimentales, notamment en systèmes acellulaires, ont été obtenues. Le mécanisme intime de cette action paraît être l'inhibition de la fixation du complexe aminoacide-ARNt synthétase sur le complexe ribosome-messager (Duval et Soussy, 1985; Bergogne et Dellamonica, 1995).

1.3.3. Aminosides

Selon Bryskier (1999), ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémisynthétiques. Elles sont classées par Umezawa en 1979 puis par Bryskier en 1995 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes : Streptomine, 2 désoxystreptomine et Streptidine.

1.3.4. Macrolides

Selon Bourin et al. (1994), les macrolides sont des antibiotiques fréquemment utilisés en pratique de ville à cause de leur facilité d'emploi. Ils ont un spectre étroit, et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Ils ont une excellente pénétration tissulaire.

1.3.5. Quinolones

Selon Bryskier (1999), les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro 1,4 oxo 4 quinoleine carboxylique. La première molécule des quinolones est Negram

(Acide nalidixique). Depuis, plusieurs molécules ont été synthétisées pour exalter le pouvoir antimicrobien et améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques.

Schématiquement les quinolones sont classées sur la base de l'étendue du spectre antibactérien et la nature fluorée ou non du squelette en deux groupes :

- Les quinolones de première génération.
- Les quinolones de deuxième génération.

1.3.6. Sulfamides

Selon Duval et Soussy (1985), ils se constituent d'un noyau paraminobenzènesulfonamide avec un radical R déterminant leur pharmacocinétique et leur classification pratique selon leur durée d'action et / ou leur site d'action.

1.3.7. Antibiotiques polypeptidiques

Les antibiotiques polypeptidiques sont constitués d'enchaînement d'acides aminés. Ils sont produits par des bactéries du genre *bacillus* ou par d'autres espèces du genre *stréptomyce*. Dans leur structure ils présentent quelques acides aminés. On distingue les polypeptides cycliques à usage parentéral ou local et les polypeptides à usage strictement local (Bourin, 1994).

❖ Mécanisme d'action

Ce sont des antibiotiques polypeptidiques, inhibiteurs de la membrane cytoplasmique (Bryskier, 1999).

❖ Spectre d'activité

Ces substances ont un spectre étroit, actif exclusivement contre les bacilles aérobies, Gram négatif, dont *pseudomonasaeruginosa* (Bryskier, 1999).

Le Tableau 1 résume les familles des antibiotiques.

Tableau 1: Familles d'antibiotiques (Neuman, 1979)

Familles	Molécules	
Bétalactamines	Pénicilline, Céphalosporines, Mecillinam –pivnécillinam Acide clavulanique	
Macrolides et apparents	Erythromycine, Oléandomycine, Spiramycine, Kitasamycine, Lincomycine, clindamycine, Rosamycine ; Midecamycine	
Tétracyclines	Tétracycline, Chlortétracycline ; Déméthychortétracyclines ; Oxytétracycline, Méthacycline, Doxycycline, Minocycline	
Synergistines	Virginiamycine Pristinamycine	
Antibiotiques à structure d'acides aminés	Chloramphénicol Thiamphénicol	
Polypeptides surfactifs	Polymyxine –Colistine	
Aminoglycosides	I ^{er} sous groupe	Streptomycine Dihydrostreptomycine
	II ^{ème} sous groupe	Néomycine Framycétine
	III ^{ème} sous –groupe	Kanamycine Paramomycine Lividomycine, Amikacine Békanamycine
	IV ^{ème} sous –groupe	Gentamicine, Tobramycine, Sisomicine, Ribostamycine,

1.4. Associations d'antibiotiques

Selon Bezoen *et al* (1999), les antibiotiques doivent autant que possible être utilisés seuls, c'est la règle générale de la mono-antibiothérapie. Toutefois on est souvent conduit en thérapeutique anti-infectieuse à associer plusieurs antibiotiques soit :

- Pour retarder l'apparition d'une antibiorésistance microbienne, mais uniquement chromosomique.

- Pour assurer une couverture antibiotique en urgence (c'est-à-dire pour élargir le spectre d'activité) devant une infection à germes inconnus lors d'infection poly-bactériennes ou lorsque l'on ignore la nature du germe en cause, c'est la principale raison en médecine vétérinaire.
- Afin de rechercher une synergie.
- Limiter les effets indésirables, notamment la toxicité de certains antibiotiques en réduisant les doses de chacun.

1.5. Mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent essentiellement par inhibition de réaction de synthèse variée. Ils se fixent sur des sites précis ou cibles moléculaires de la cellule bactérienne ce qui entraîne la perturbation de diverses réactions métaboliques (Figure 1). Les cibles sont caractéristiques de chaque famille d'antibiotique. Elles ne sont pas toujours connues avec précision et correspondent à 6 niveaux différents de la cellule bactérienne ou fongique : La paroi, la membrane cytoplasmique, le génome ; réplication et transcription du acide désoxyribonucléique (ADN) (Fontaine, 1992).

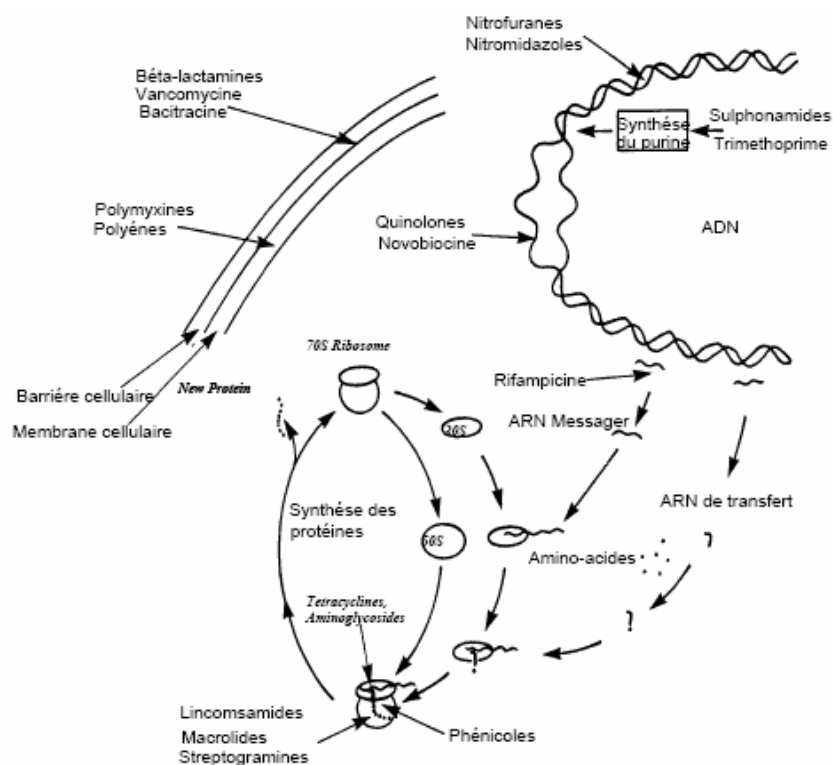


Figure 1 : Principaux sites d'action des antibiotiques, (Oxoby, 2002; Puyt et Guérin-Faublée, 2006; Errecalde, 2007 ; Cuq, 2008)

1.5.1. Activité antibactérienne

En fonction de leur type d'activité vis-à-vis des bactéries, on distingue classiquement les antibiotiques bactériostatiques et bactéricides. Cette activité s'apprécie in vitro par le dénombrement de la population bactérienne après mise en culture en présence de l'antibiotique à des concentrations proches de la CMI (**Fontaine, 1992**).

1.5.2. Activité bactériostatique

Il y a un effet bactériostatique lorsque, après introduction d'un antibiotique, le nombre de germe est inférieur à celui du témoin sans antibiotique, tout en restant supérieur à celui de l'inoculum de départ (**Fontaine, 1992**).

1.5.3. Activité bactéricide

Il y a un effet bactéricide lorsque, après l'introduction d'un antibiotique avec une concentration élevée à CMI, le nombre de germes devient inférieure à celui de l'inoculum ; l'action de l'antibiotique aboutit à la mort des germes (**Fontaine, 1992**).

1.5.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Représente la concentration minimale d'antibiotique capable d'inhiber in vitro la multiplication bactérienne. Elle permet d'apprécier le degré de sensibilité d'un germe à l'action d'un antibiotique déterminé. Un ATB sera donc actif sur le plan thérapeutique lorsqu'après administration, les concentrations réalisées dans le sang ou les tissus sont supérieures à la concentration minimale inhibitrice (**Fontaine, 1992**).

1.5.5. Concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide qui se définit comme la plus faible concentration laissant après 18 heures 1 survivant pour 1000 bactéries viables ensemencées (soit 0.01) de survivants (**Larpent et al., 1989**).

1.6. Facteurs de variation des paramètres pharmacocinétiques

Il existe trois principaux types de facteurs pouvant modifier les paramètres pharmacocinétiques d'un antibiotique :

- Des facteurs liés au médicament.
- Des facteurs liés au mode et à la voie d'administration.
- Des facteurs liés à l'animal.

1.6.1. Facteurs liés au médicament

La forme galénique du médicament joue un rôle capital dans l'absorption et la distribution du principe actif dans l'organisme. La forme chimique exacte du composé intervient dans son absorption et sa distribution (**Enriquez et Boulouis, 1990**). La forme physique et les excipients jouent un rôle dans la diffusion du ou des principes actifs. De nombreux constituants utilisés dans les spécialités pharmaceutiques, interviennent dans la diffusion (**Fiscus-mougel, 1993**).

1.6.2. Facteurs liés au mode et à la voie d'administration

1.6.2.1. Administration intraveineuse

L'administration intraveineuse correspond à l'introduction du médicament directement dans la circulation sanguine. Il n'y a donc pas de phase d'absorption et la phase de distribution commence immédiatement (**Stoltz, 2008**).

1.6.2.2. Administration intramusculaire et sous cutané

Les voies intramusculaire et sous-cutanée se distinguent surtout par la distance à franchir avant d'atteindre la circulation sanguine. En général, la résorption est plus rapide après une injection intramusculaire. Cependant, la vitesse de résorption peut être augmentée ou diminuée par la forme galénique (formulation longue action ou retard) (**Stoltz, 2008**).

1.6.2.3. Administration orale

La voie orale est assez complexe car de multiples facteurs interviennent comme les particularités du système gastro-intestinal dans les différentes espèces, la présence d'aliments ou encore la maturité du système digestif (**Stoltz, 2008**).

1.6.2.4. Administration intra mammaire

L'administration intra mammaire est une voie couramment utilisée chez les vaches laitières. L'absorption est ici fortement modulée par l'état de la glande mammaire elle-même, notamment en cas d'infection (**Stoltz, 2008**).

1.6.3. Facteurs liés à l'animal

Les facteurs liés à l'animal correspondent essentiellement à son espèce mais également à l'âge ou à l'état physiologique (**Enriquez et Boulouis, 1990**).

1.7. Pharmacocinétique des antibiotiques

Le terme de métabolisme des antibiotiques désigne l'ensemble des phénomènes physico chimiques et biochimiques qui régissent le cheminement de ces substances dans l'organisme (**Neuman, 1979; Le Chat, 2007; Saux, 2006**).

1.7.1. Absorption

L'absorption correspond au transfert du principe actif depuis son lieu d'administration vers le secteur plasmatique (**Neuman, 1979**).

1.7.1.1. Absorption digestive

L'absorption digestive se fait essentiellement au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. La muqueuse digestive peut être considérée comme une membrane lipoprotéique à pores. L'absorption répond donc aux règles du passage transmembranaire. Dans le tube digestif, la fraction solubilisée d'un antibiotique est seul à être résorbé, cette résorption résulte en fait de l'addition de deux vitesses qui sont (**Le Chat, 2007**) :

- vitesse de dissolution de la forme galénique administrée.
- vitesse de processus de résorption de l'antibiotique à la muqueuse digestive.

1.7.1.2. Absorption parentérale

L'administration par voie parentérale, peut se faire soit par injection intraveineuse, soit par injection intramusculaire, elle est particulièrement utilisée en médecine vétérinaire car elle représente souvent une voie plus commode que la voie orale (**Le Chat, 2007**). Le rythme d'absorption peut être ralenti par certains artifices modifiant la molécule ou par association de certains composants par les tissus moins irrigués (peau, tissus graisseux) et qui fait fonction de réservoir.

1.7.2. Distribution

Après absorption, les substances chimiques vont être distribuées dans tout l'organisme, essentiellement par voie sanguine, elles se fixeront sur divers organes et tissus en fonction de différents paramètres tenant à la substance considérée et à l'organe en cause (**Le Chat, 2007**). Toutefois, l'importance de la diffusion dans les tissus est variable selon les médicaments.

1.7.3. Biotransformation

Au cours de leur passage dans l'organisme, la plupart des médicaments subissent diverses modifications de leur structure chimique du fait de l'intervention de nombreux systèmes enzymatiques. Le foie est le principal lieu de ce métabolisme. Le plus souvent, les transformations métaboliques inactivent le médicament mais c'est parfois l'inverse qui se produit. Certains médicaments ne sont pas du tout métabolisés et traversent tels quels l'organisme qui les reçoit. Il existe essentiellement quatre principaux types de biotransformations : l'hydrolyse, l'oxydation, la réduction et la conjugaison, qui aboutissent généralement à des métabolites plus polaires et plus hydrosolubles, susceptibles d'être éliminés plus rapidement que la molécule initiale (**Bourin et al., 1994**).

Aussi, on peut définir les biotransformations comme un ensemble de réaction biochimique, en général enzymatiques, ayant pour effet de modifier la structure des substances introduites dans l'organisme (**Fontaine, 1992 ; Le Chat, 2007**).

1.7.4. Elimination

Sur le plan cinétique, l'élimination est un facteur essentiel. Il s'agit de déterminer les voies d'élimination et de quantifier la vitesse d'élimination de l'ATB. La vitesse d'élimination est appréciée par la demi-vie plasmatique de l'ATB, même s'il serait plus correct d'évaluer la clairance de la molécule (mais ce paramètre est plus difficile à déterminer). Il existe diverses voies d'élimination, mais les deux principales sont la voie hépatique et la voie rénale. La voie hépatique est difficile à étudier, de ce fait les études la concernant sont peu nombreuses, alors que les recherches sur la voie rénale sont courantes (**Larpen et Sanglier, 1989**). Le devenir d'un antibiotique et son passage (ou non) dans le lait dépend, quelle que soit la voie d'administration, de trois éléments (**Duval et Soussy, 1990**).

- Le métabolisme: le médicament est plus ou moins transformé et dégradé au sein de l'organisme.
- La capacité de la molécule à traverser des membranes: paroi des vaisseaux sanguins, membranes cellulaires.
- Les modalités d'élimination par les différentes voies: urine, fèces, salive et lait.

La concentration d'un médicament dans le lait sera fonction de sa concentration dans le plasma, de son poids moléculaire et de son degré de liposolubilité dans les matières grasses du lait. La concentration est maximale pour les bases faibles peu liées aux protéines plasmatiques et plus ionisées dans le lait que dans le sang. L'élimination des ATB par mamelle s'effectue selon ces données (**Rasmussen, 1970**).

CHAPITRE 2 : RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALES

2.1. Définition

Les résidus sont définis comme toute substance pharmaco-logiquement active, qu'il s'agit de principe actif, d'excipient ou de métabolite présent dans les liquides et tissus des animaux après administration des médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produit par ces animaux (**Laurentie et Sanders, 2002**).

L'expression "résidus de médicaments vétérinaires" désigne les résidus de substances originales, de leurs métabolites ou de leurs impuretés appliquées ou administrées par les différentes voies à des animaux à titre de médicaments et restant dans certains produits d'origine animale destinés à l'alimentation (**Kölbener et al. 2005; Cartier, 2007**).

2.2. Origine des résidus des médicaments vétérinaires

Les résidus sont des substances pouvant apparaître dans les denrées alimentaires par suite de l'utilisation de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires. Il s'agit de traces indésirables de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final (**Châtaigner et Stevens, 2003**).

Les causes possibles de tels résidus sont (**Chataigner, 2004**) :

- L'inobservation de la dose ou du mode d'emploi recommandés sur l'étiquette.
- Le non-respect des délais d'attente exigés.
- L'utilisation de matériel contaminé ou incorrectement nettoyé.
- La contamination de l'environnement.

2.3. Utilisation des antibiotiques

Le tableau 2 résume les principaux types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à la consommation humaine.

Tableau 2: Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine (Kirkpatrick, 2002).

Type d'utilisation d'antimicrobiens	But	Voie ou mode d'administration	Administration individuelle ou par groupe	Animaux malades
Thérapeutique	Thérapie	Injection, aliments, eau	Individuelle ou par groupe	Animaux malades ou certains animaux dans des groupes
Métaphylactique	Prophylaxie de la maladie thérapie	Injection (veaux en parc d'engraissement)	Groupe	Certains
Prophylaxie	Prévention de la maladie	Aliments	Groupe	Rien d'évident, bien que certaines infections
				Puissent être subcliniques
Stimulateur de Croissance	Stimulation de la croissance	Aliments	Groupe	Aucun
	Indice de Consommation	Aliments	Groupe	Aucun

2.3.1. Utilisation des antibiotiques à titre thérapeutique curatif ou en antibio-prévention

Les antibiotiques peuvent être utilisés à titre thérapeutique curatif dont l'objectif est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Ainsi, ils peuvent être administrés à des périodes critiques de la vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue. Dans ces conditions, on parle d'antibio-prévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire et ponctuelle. L'antibio-prophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes **(Stoltz, 2008)**.

2.3.2. Utilisation en métaphylaxie

Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie **(Maillard, 2002)**.

2.3.3. Utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires

Les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance afin d'améliorer la productivité des élevages **(Bories et Louisot, 1998; Sanders, 2005; Jank et al. 2015)**.

Dans son avis du 28 mai 1999, le comité scientifique directeur de la direction générale de la commission européenne, a déclaré que l'utilisation en tant que facteurs de croissance d'antimicrobiens appartenant aux catégories utilisées en médecine humaine et animale, ou susceptibles de l'être devrait être réduite le plus vite possible et à terme proscrite. Dans un deuxième avis, adopté en mai 2001, ce comité directeur soulignait que ce processus d'élimination devait être planifié et coordonné. **Le règlement n° 1831/2003 du 22/11/2003** de la commission européenne prévoyait la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale à la fin de l'année 2005 et c'est en 2006 que l'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux était banni dans l'union européenne **(Guillemot, 2006)**.

2.3.4. Conséquences négatives de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux

Les conséquences négatives de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux sont (**Klotins, 2006**):

- présence de résidus dans les produits alimentaires d'origine animale (si les délais d'attente avant l'abattage ne sont pas respectés).
- contamination de l'environnement (excrétion des antibiotiques par les fèces, urines...).

Selon Scippo, (**2008**), ces conséquences sont surtout dues aux mauvaises pratiques:

- produits du marché noir.
- administration sans prescription vétérinaire.
- non respect des doses et des délais d'attente.

2.3.5. Conséquences liées à la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires :

D'après **Laurentie et Sanders (2002)**, les réflexions sur les résidus et les soucis de protéger la santé des consommateurs ont abouti au développement de deux concepts complémentaires:

- Les limites maximales de résidus, ou LMR.
- Le temps d'attente, ou TA.

Ces deux concepts sont appliqués dans toute l'union Européenne et reconnu internationalement dans le cadre du codex alimentaire.

2.3.5.1. Limite maximale résiduelle (LMR)

Concentration maximale de résidus résultant de l'emploi d'un médicament vétérinaire (exprimé en mg/kg ou en µg/kg sur la base du poids frais) légalement permise ou estimée acceptable dans un aliment (**règlement N° 2377/90/CEE**).

Selon **puyt et sachot ; (2001)** sa détermination est basée sur la détermination de la :

***Dose sans effet (DES)** : c'est la quantité de résidus la plus élevée n'entraînant aucune incidence (pharmacologie ou toxicologie) pour le consommateur.

***Dose journalière admissible (DJA)** : elle est obtenue en appliquant à la DES un facteur de sécurité dépendant du profil toxicologique de la molécule.

2.3.5.2. Délai d'attente

Il correspond au délai entre la dernière administration d'un médicament à des animaux, dans des conditions normales d'emploi et la production de denrées alimentaires issues de ces animaux, garantissant que ces denrées ne contiennent pas de résidus du médicament en quantité supérieure à sa LMR (Tableau 3) (**Directive 81/851/CEE**).

Le délai d'attente (pour le lait) correspond au premier temps de traite pour lequel la concentration en résidus est inférieure ou égale à la LMR (**puyt et sachot, 2001**).

Tableau 3: Délai d'attente de quelques antibiotiques, (**Milhaud, 1978**).

Antibiotique	Animaux de Boucherie	Animaux Laitiers	Volailles pondeuses (OEufs)
Oxytétracycline	2 semaines	1 semaine	
Spiramycine	3 semaines	3 semaines	3 jours (Voie orale) 3 semaines (autres voies)
Oléandomycine	Voie orale 5 Jours	5 jours	
Tylosine	3 semaines	3 semaines	3 jours (Voie orale), 2 semaines (formes injectables)
Polymyxine B	Voie orale 3 jours Autres voies 1 Mois		

2.3.5.3. Lien entre temps d'attente et LMR

Les vétérinaires praticiens ou les éleveurs ne peuvent pas estimer la concentration résiduelle dans les tissus ou dans le lait qui dépend de plusieurs facteurs : liés au médicament tels que la forme galénique (émulsion, suspension), les conditions d'emploi (posologie, voie d'administration) mais qui dépendent aussi de l'animal (état physiologique, race).

Ils ne peuvent donc pas utiliser directement la LMR.

Il faut alors déterminer un temps pour lequel les concentrations résiduelles dans les productions animales sont inférieures aux LMR après la dernière administration du médicament. Ce temps est appelé temps d'attente (**Stoltz, 2008**).

2.4. Nature des résidus

La nature chimique des résidus est fortement conditionnée par les biotransformations et les méthodes de dosage et d'identification ont permis de distinguer deux grands types de résidus : les résidus extractibles et les résidus non-extractibles. Cette distinction est basée sur les possibilités de passage des composés étudiés dans les solvants d'extraction.

2.4.1. Résidus extractibles

Les résidus extractibles ou « libres » représentent la fraction pouvant être extraite des tissus ou des liquides biologiques par divers solvants, avant et après dénaturation des macromolécules. Les composés concernés sont le principe actif initial et ses métabolites, en solution dans les liquides biologiques ou liés par des liaisons non covalentes, donc labiles, à des biomolécules. Ce sont des résidus précoces, qui prédominent dans les premiers jours suivant l'administration du médicament, mais ayant une demi-vie assez brève et dont le taux devient généralement négligeable trois à cinq jours après le traitement. Ils ne forment qu'une proportion faible des résidus totaux (**Dziedzic, 1988**).

2.4.2. Résidus non-extractibles

Ils constituent la fraction des résidus qui persistent dans les échantillons de tissus analysés après isolement des résidus libres. Leur nature ne peut être déterminée qu'après destruction quasi-complète des protéines, par hydrolyse enzymatique ou acide par exemple. Les résidus non-extractibles forment des complexes macromoléculaires avec des protéines par fixation du principe actif initial ou d'un de ses métabolites sur des protéines. Ces résidus liés ont une demi-vie assez longue et constituent la majeure partie des résidus tardifs (**Dziedzic, 1988**).

2.4.3. Niveau des résidus

Les niveaux des résidus sont très faibles, ils sont exprimés par :

PPm (partie par un million) =1mg/kg

PPb(partie par billion) =1micron g/kg

PPT(partie par trillion) =1nano g /kg

Il ne faut utiliser des denrées provenant d'animaux traités que lorsque tous les médicaments administrés auront été totalement éliminés. Cependant, compte tenu des grands moyens analytiques, on aboutit pratiquement toujours à l'existence des résidus décelables mais ils sont à très faibles concentrations et ne sont pas forcément toxique (**Derache, 1991**).

2.5. Propriétés des résidus

2.5.1. Notion de biodisponibilité et de biodisponibilité de relais

La biodisponibilité des résidus pour le consommateur, ou biodisponibilité secondaire (par opposition à la biodisponibilité du médicament chez l'animal, qualifiée de primaire) représente la possibilité d'absorption par voie digestive des résidus de médicaments présents dans une denrée d'origine animale. Elle est définie par la FDA (Food and Drug Administration) par : « les résidus biodisponibles correspondent aux composés, molécules initiales ou métabolites, absorbés au niveau du tractus digestif et qui peuvent être retrouvés dans les cellules gastro-intestinales, les liquides biologiques ou le CO₂ expiré de l'espèce qui ingère ces résidus ». Selon la nature des résidus, libres ou liés, la biodisponibilité ne sera pas la même celle de la fraction résiduelle extractible est supérieure à celle des résidus liés.

La biodisponibilité des résidus peut être évaluée par la biodisponibilité globale des résidus totaux. Il s'agit alors d'une « biodisponibilité de relais » qui nécessite un animal relais.

Des expérimentations ont montré que la biodisponibilité secondaire d'une substance est inférieure à sa biodisponibilité primaire. Le facteur limitant correspond à la fraction liée des résidus. L'étude de la biodisponibilité de relais permet d'apprécier le risque encouru par le consommateur et permet d'aborder les notions de « toxicodisponibilité » et de « toxicité de relais » (**Dziedzic, 1988**).

2.5.2. Notion de toxico-disponibilité

Les métabolites reconnus toxiques sont en général extractibles et donc relativement Bio-disponibles. Leur toxico-disponibilité est donc toujours à craindre **(Dziedzic, 1988)**. Les résidus liés sont généralement peu bio-disponibles. Leur toxico-disponibilité est donc faible **(Labie, 1982)**.

D'autre part, les résidus liés sont également peu accessibles à la réponse immune de l'organisme pouvant entraîner une réaction allergique.

2.6. Dangers liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale :

Une portion non négligeable des produits laitiers retrouvés sur le marché, tels les yogourts et les fromages, sont préparés par fermentation du lait à l'aide de bactéries lactiques. Les caractéristiques texturales et organoleptiques de ces produits sont directement liées au degré de croissance de ces bactéries dans le lait de départ. Occasionnellement, et à cause de la présence des antibiotiques, certains laits sont jugés impropres à la consommation et à la transformation en produits fermentés **(Barbut et Petit, 2007)**.

Les risques pour le consommateur et la Santé Publique liés à cette présence de résidus dans les denrées alimentaires sont **(Reig et Toldra, 2008)** :

- risque de toxicité directe,
- risque allergique,
- risque cancérigène,
- risque de pathologie liée à la modification de la flore digestive,
- risque d'apparition, de sélection et de dissémination de résistances bactériennes aux antibiotiques au sein des populations humaines et animales.

La présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires, et notamment le lait, pose également un problème à l'Industrie agroalimentaire pour la fabrication de produits fermentés. Les résidus d'antibiotiques sont alors appelés « inhibiteurs ». Ainsi, la notion d'inhibiteur correspond à un problème technologique et la notion de résidu correspond à un problème de santé publique **(Fabre et al., 2002)**.

2.6.1. Toxicité directe des résidus d'antibiotiques

Les antibiotiques sont des médicaments antibactériens d'origine naturelle, produits à partir des champignons ou des bactéries ou obtenus par synthèse ou semi-synthèse. Ils ont en principe une toxicité sélective, c'est-à-dire qu'ils sont toxiques pour les bactéries mais non pour l'organisme; ce qui malheureusement n'est pas toujours vrai. Comme pour tout médicament actif, les antibiotiques sont susceptibles de provoquer des accidents plus ou moins importants. Il faut cependant signaler que du fait de leur mode d'administration qui se fait souvent par voie générale, les antibiotiques constituent une classe relativement peu toxique. Ces effets indésirables, même s'ils sont relativement peu fréquents et rarement graves doivent dans tous les cas faire l'objet d'une déclaration au niveau des centres de pharmacovigilance (**Clive et al, 1999**).

2.6.2. Risque allergique

Les résidus des médicaments vétérinaires sont incriminés en allergie humaine et peuvent être mis en cause dans certains accidents d'hypersensibilité chez les personnes allergiques en entraînant soit un effet sensibilisant soit un effet déclenchant (effet des pénicillines) (**Diop, 2003**).

Sur propositions de COOMBS et GELL, le comité mixte (**FAO/OMS, 1990**) reconnaît qu'en général la sensibilisation initiale d'un sujet réceptif a lieu après administration d'une dose assez importante de substance ayant un pouvoir allergique et qu'un contact ultérieur, souvent avec une dose beaucoup plus faible, peut provoquer une réponse allergique (**FAO/OMS, 1990**).

Les antibiotiques, particulièrement les dérivés B- lactames et leurs produits de dégradation, sont bien connus pour provoquer des réactions allergiques. Les patients ayant des antécédents d'allergie atopique paraissent particulièrement susceptibles de développer ces réactions. Les sulfamides, le triméthoprime, la nitrofurantoïne et l'érythromycine ont aussi été associés à des réactions d'hypersensibilité, particulièrement des rashes (**Chambers et Sande, 1998**).

2.6.3. Risques cancérogènes

Certains antibiotiques ont des propriétés carcinogènes connues. Les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir un effet carcinogène sur le long terme, suite à une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. Ces antibiotiques ou composés utilisés comme

antibiotiques sont alors interdits d'utilisation chez les animaux de production. C'est le cas des nitrofuranes et des nitroimidazoles (**Leitner et al, 2001**).

Afin de prévenir tout risque cancérigène chez les consommateurs, l'utilisation des nitrofuranes est interdite chez les animaux de rente depuis 1993 en France et dans l'Union Européenne (Règlement 2901/93) ainsi que dans la plupart des pays du monde. La furazolidone a été interdite, chez les animaux de rente, en 1997 en France en raison d'effets sur la santé, notamment la possibilité d'un risque cancérigène en cas de consommation à long terme (**Afssa, 2006**).

2.6.4. Risque bactériologique

Ces risques bactériologiques sont représentés par deux phénomènes principaux correspondant à des modifications qualitatives et/ou quantitatives de la flore bactérienne du tube digestif des consommateurs (**Milhaud et Person, 1981**) Ce sont :

- La sélection de souches bactériennes résistantes.
- Le déséquilibre de la flore bactérienne normale du tube digestif.

2.6.4.1. Sélection de souches bactériennes résistantes

De nombreux travaux scientifiques ont démontrés que la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires était à l'origine de l'émergence de résistances bactériennes chez les humains, ceci s'explique par le fait que la présence d'un antibiotique à des taux supérieurs à la concentration minimale inhibitrice entraînerait des modifications génétiques au niveau bactérien conférant ainsi à la bactérie la possibilité de survivre en présence de l'antibiotique en question (**Chataigner et Stevens, 2002**).

2.6.4.2. Modification de la microflore intestinale

Les antibiotiques peuvent tuer certaines bactéries, ou diminuer leur aptitude à proliférer dans l'intestin par différents mécanismes qui sont (**Lopry et al, 1992**) :

- diminution de vitesse de croissance,
- diminution de l'affinité pour le substrat nutritionnel,
- diminution de l'adhésion.

La flore intestinale est un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques : l'utilisation d'un antimicrobien entraîne une perturbation de celle-ci et une rupture de l'équilibre avec l'hôte, pouvant aboutir à l'installation de germes pathogènes et à une dissémination (**Chatellet, 2007**). Ce phénomène est appelé « abaissement des barrières microbiologiques » ou « diminution de la résistance à la colonisation » (**Vanderwaaij, 1992**).

Notre tube digestif contient des bactéries dites entérobactéries avec lesquelles nous cohabitons toute notre vie. Leur fonction principale est de nous protéger en permanence contre les toxines, les microbes, les virus et les germes pathogènes nocifs présents dans l'environnement mais également dans nos aliments. L'activité des antibiotiques peut provoquer la mort de certaines bactéries ou diminuer leur aptitude à proliférer dans l'intestin. L'atteinte de certaines populations bactériennes qui font partie de la flore normale entraîne le développement d'autres populations pouvant être pathogènes ou opportunistes (**Wang et al. 2006; Borràs et al. 2011**).

Une bactérie résistante aux antibiotiques peut être sélectionnée par un résidu d'antibiotique, soit directement par l'élimination de la bactérie sensible correspondante, soit indirectement par l'affaiblissement des barrières. Les bactéries non pathogènes résistantes aux antibiotiques ne sont pas dangereuses. Cependant, la gravité des infections opportunistes est très augmentée par les résistances. De plus, ces résistances peuvent être transmises à des bactéries pathogènes si leur support génétique est mobilisable (plasmide, transposon) (**Stoltz, 2008**).

CHAPITRE 3 : METHODES DE DETECTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

3.1. Introduction

Selon **Scippo (2008)**, le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires est un processus complexe et coûteux. Mais il est indispensable pour garantir:

- La protection de la santé publique.
- Le respect des règles qui régissent le commerce.
- La production de matières premières de qualité pour l'industrie agroalimentaire.

3.2. Méthodes de dépistage

3.2.1. Principe des méthodes de dépistage

Les méthodes de dépistage sont des méthodes qualitatives qui ont pour but de discerner les échantillons positifs des échantillons négatifs. Ces contrôles sont basés sur l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Les échantillons conformes sont acceptés tandis que ceux suspectés d'être non-conformes doivent être confirmés à l'aide de méthodes de confirmation.

Les principales exigences des méthodes de dépistage sont (**Reig et Toldra, 2007**):

- ❖ La méthode employée doit être capable de détecter le résidu en-dessous de sa LMR.
- ❖ La méthode employée doit éviter ou réduire au minimum le nombre de résultats faux négatifs car ces échantillons seront alors considérés conformes et ne seront pas plus analysés. Selon la **Décision (2002/657/EC de la Commission)**, les méthodes doivent être validées et avoir une capacité de détection (CCb) avec une probabilité d'erreur inférieure à 5 %.
- ❖ Les méthodes de dépistages ne devraient pas non plus donner un nombre excessif de faux-positifs, qui seront plus tard confirmés comme conformes car cela entraîne un surcoût en temps et en matériel.

3.2.2. Description des méthodes de dépistage

Deux types de tests sont utilisés pour rechercher les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale (Tableau 4) (**Fergusson et al., 2002**) :

- Des tests microbiologiques qui utilisent le principe de la croissance bactérienne ; ce sont des méthodes bactériennes encore appelées méthodes d'inhibition,
- Des tests qui utilisent des méthodes physico-chimiques, tel que la chromatographie en couche mince, la chromatographie en phase liquide ou la chromatographie en phase gazeuse, des techniques enzymatiques ou des techniques immunologiques.
-

Tableau 4 : Comparaison entre les méthodes bactériennes et les méthodes physico-chimiques et immunologiques pour la recherche des résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale (**Fabre et al., 2004 ; Brouillet, 2002**).

	Méthodes bactériennes	Méthodes physico-chimiques et immunologiques
Principe	Mise en évidence du pouvoir d'inhibition de la croissance des souches sélectionnées	Dosage des molécules (résidus)
Les différences des méthodes	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode officielle des quatre boîtes - Méthode des trois boîtes - Le « Fast antibiotic screen test » - Le Premi Test - Le Delvotest SP® - le Copan Test P® et S 100® - le Valio T® 	<ul style="list-style-type: none"> - Spectrométrie de masse - Chromatographie en phase liquide - Chromatographie en phase gazeuse - Chromatographie en couche mince - La méthode E.L.I.S.A - Tests enzymatiques : exemple : Test Penzym® - Tests immunoenzymatiques
Particularités	<ul style="list-style-type: none"> Large spectre de recherche de molécule antibiotique - Première étape des plans de contrôle - Utilisées quand l'antibiotique est inconnu 	<ul style="list-style-type: none"> Grande variabilité des seuils de détection - Utilisées pour doser un antibiotique connu

3.2.3. Méthodes microbiologiques

Les méthodes microbiologiques sont très largement utilisées en routine, sont qualitatives et constituent la première étape des plans de contrôle, et sont basées sur l'inhibition de la croissance bactérienne. Ces méthodes consistent à effectuer un contrôle positif «un antibiotique auquel la souche utilisée est sensible» et un contrôle négatif «l'eau distillée stérile ou un lait ne contenant pas d'antibiotiques» pour permettre de valider les résultats (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999).

3.2.3.1. Méthodes des quatre boîtes

Repose sur l'utilisation des boîtes de Pétri sur lesquelles sont déposés des disques de la viande à tester (Figure 2). Ces boîtes contiennent différents milieux de culture, sontensemencées avec différentes bactéries sensibles à des familles d'antibiotiques différents (Tableau 5). La présence d'antibiotique dans la viande se traduit, après 24 heures de culture, par une zone d'inhibition autour du disque de viande. Si le diamètre d'inhibition est supérieur à 2mm, le morceau de viande est considéré comme positif (Maghuin, 2002).



Figure 2: Méthode des quatre boites (Maghuin, 2002).

Tableau 5 : Présentation de la méthode des quatre boites utilisée pour le contrôle officiel (Gaudin et al, 2006).

Boite	1	2	3	4
Souche	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Micrococcus Luteus
pH	6	7.4	8	8
Observation		Ajout Trimethoprim		
Molécule cible	Bétalactames + Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bétalactames + Macrolides

3.2.3.2. Test d'acidification

Pour ce test, on utilise une culture d'une bactérie capable de dégrader le lactose en acide lactique et un indicateur de couleur, le pourpre de bromocrésol, qui nous permet de savoir s'il y a eu acidification du milieu. La souche la plus adaptée pour cette méthode est *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* C953 (souche C953, CIP 5281) (Ben Mahdi et Ouslimani, 2009).

Si le lait analysé contient des antibiotiques alors les bactéries ne dégraderont pas le lactose, la couleur du milieu reste inchangée. Par contre, l'absence d'antibiotique, se traduit par le virage de la couleur du bleu vers le jaune, il y a donc acidification (Figure 4) (Singleton, 2008).

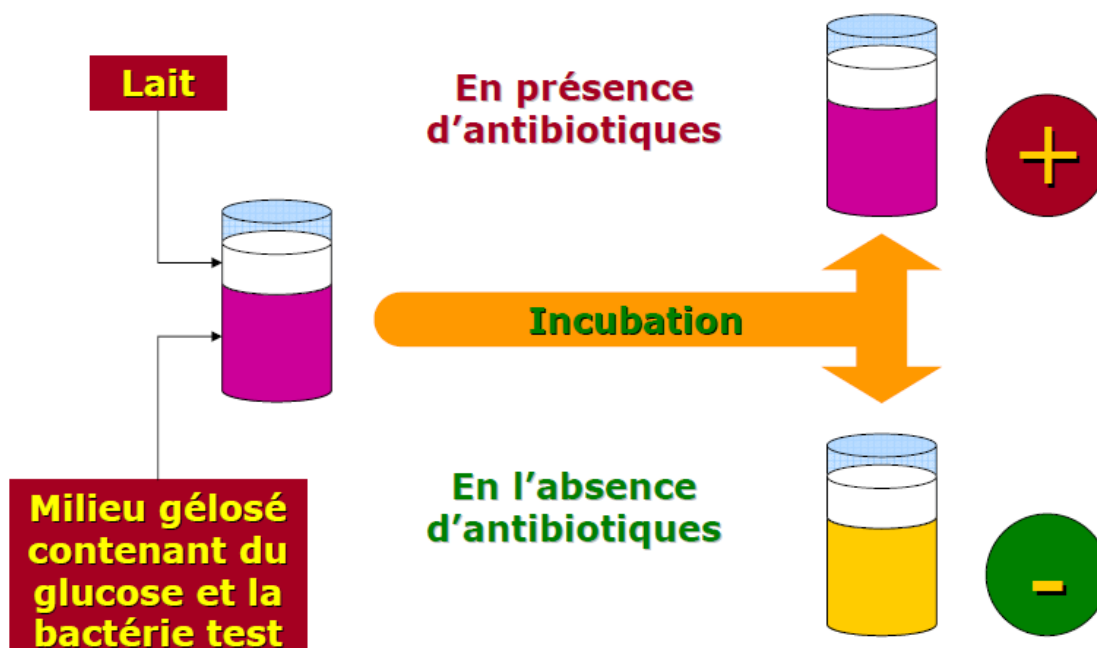


Figure 3 : Principe du test d'acidification (Singleton, 2008).

3.2.3.3. Méthode de diffusion sur gélose

Elle consiste à faire diffuser un antibiotique dans un milieu gélosé contenant une souche bactérienne sensible à cet antibiotique. Pour ce faire, on dépose des volumes identiques représentant plusieurs dilutions de la solution contenant l'antibiotique sur des rondelles de papier buvard. Ces disques sont mis en contact d'une surface gélosée contenant 10^6 à 10^7 cellules souches indicatrices ou de spores. Pendant l'incubation, l'antibiotique diffuse dans la gélose de façon radiaire à partir de son point d'application. Après 15 à 48 heures à la température optimale de croissance du micro-organisme, on mesure les diamètres d'inhibition qui apparaissent sous l'aspect de zones claires (Talnan, 2013).

3.2.4. Méthodes physico-chimiques

Les années 80 ont été marquées par le développement de nouvelles méthodes de dépistage comme HPLC, la chromatographie sur couche mince et l'électrophorèse. Bien que ces méthodes, produisent des résultats précis du niveau des résidus d'antibiotiques, elles sont cependant, très coûteuses, très lentes, et demandent des compétences techniques spécialisées (Boultif, 2014).

3.2.4.1. Méthodes enzymatiques

Les méthodes enzymatiques sont très rapides ont pour principe l'inhibition d'une enzyme en présence d'un résidu d'antibiotique spécifique. Cette enzyme n'est alors plus révélée par un indicateur coloré (**Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999**).

Le test le plus répandu est le Penzyme qui permet de détecter aussi peu que 0.017 UI des β -lactames dans le lait en 20 minutes seulement. Repose sur la capacité des β -lactames d'inhiber l'enzyme DD-carboxypeptidase responsable de la libération de la D-alanine à partir de l'Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala. En absence d'antibiotiques, la D-alanine est oxydée par la D-amino-oxydase et libère du peroxyde d'oxygène qui en présence d'un indicateur coloré, génère une coloration rose. En présence d'antibiotiques, cette réaction colorimétrique est inhibée et le lait demeure blanc (**Le Minor, 1982**).

3.2.4.2. Méthodes immunologiques

Sont basées sur l'interaction antigène-anticorps, qui est très spécifique pour un résidu particulier. La technique la plus répandue est l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) et le système de détection peut être basé sur des réactifs à enzymes marquées. Il y a différentes méthodes pour la quantification des antigènes, comme la méthode « double anticorps » encore appelée ELISA sandwich et le test de compétition directe ELISA (**Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999**).

Les Radio-Immuno-Assay (R.I.A.) sont compétitifs et utilisent des anticorps spécifiques pour les récepteurs des antibiotiques sont basés sur la mesure de la radioactivité du complexe immunologique en 10 minutes, ces tests permettent la détection des quantités de 05 à 80 partie par billion (ppb) (**Le Minor, 1982**).

D'autres tests utilisent la luminescence ou la fluorimétrie comme méthode de détection. Aujourd'hui, il existe de nombreux kits ELISA de différent type utilisables pour un grand nombre de substances et notamment de nombreux antibiotiques. Ils sont disponibles pour un résidu spécifique ou pour un groupe de composés apparentés comme par exemple le groupe des fluoroquinolones (**Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999**).

3.2.4.2.1. Méthodes radio immunologiques (RIA)

Dans les années 80, on a vu se développer des méthodes radio immunologiques (RIA) pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans des échantillons. Ici c'est la reconnaissance d'une molécule par un anticorps qui est détectée. Une compétition est organisée pour une liaison à des anticorps entre l'antigène non marqué, à savoir la molécule à rechercher dans l'échantillon, et un antigène de nature similaire mais marqué par un isotope radioactif (tritium, carbone 14) (Figure 4, 5) (Stoltz, 2008).

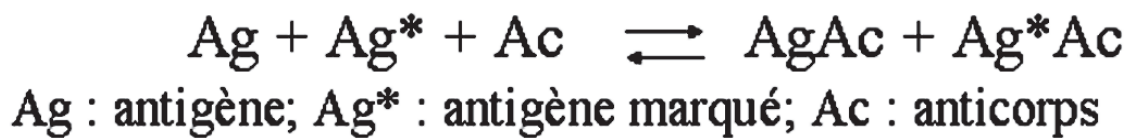


Figure 4: Equation de base des dosages immuno-chimiques par compétition (Stoltz, 2008).

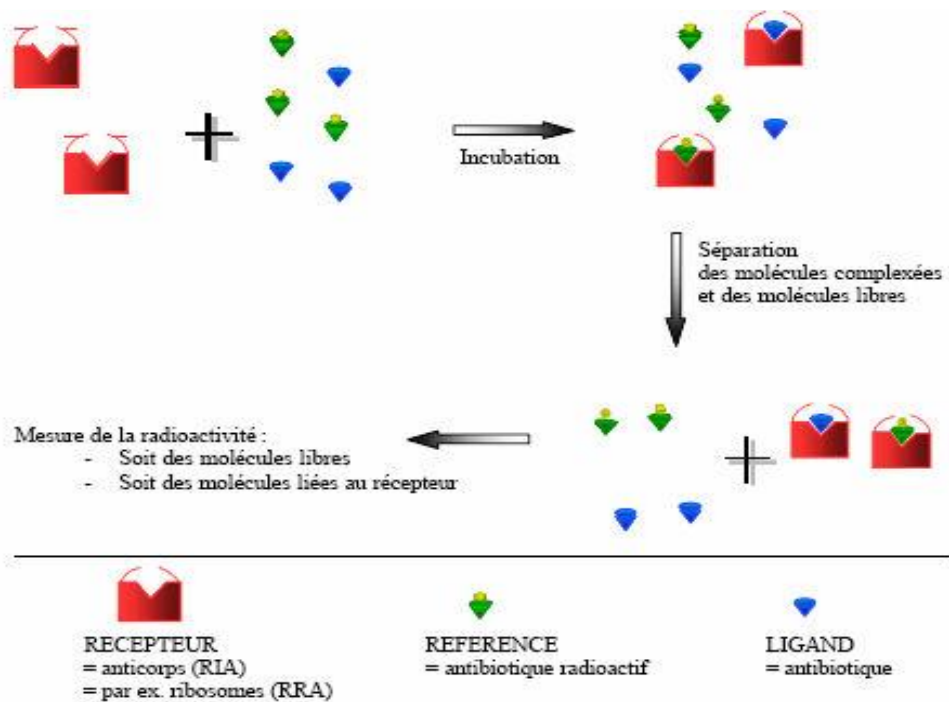


Figure 5 : Schéma de principe de RIA et RRA (Maghuin-Rogister et al, 2001).

Dans cette technique, on mesure la radioactivité liée aux anticorps après avoir éliminé la radioactivité libre. Grâce à une courbe de calibration, on peut déterminer la concentration de la substance dans l'échantillon.

Ces méthodes permettent de détecter des concentrations en résidus de l'ordre du ppb microgramme par kg) (**Stoltz, 2008**).

Les anticorps sont généralement très spécifiques.

Dans certains cas, par exemple pour le bêta agoniste ou certains antibiotiques comme les tétracyclines, il existe des anticorps capables de réactions croisées avec plusieurs substances différentes d'une même famille. Dans ce cas, un dépistage multianalyte est possible. Ces méthodes sont moins utilisées actuellement, mais plusieurs kits sont encore disponibles commercialement.

3.2.4.2.2. Test ELISA

L'ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay) est analogue au RIA.

Cette fois l'antigène est marqué par une enzyme dont l'activité liée aux anticorps peut être mesurée grâce à une coloration correspondant à la transformation du substrat de l'enzyme en produit.

La réponse est inversement proportionnelle à la concentration en analyte dans l'échantillon.

De nombreux kits de dosage Elisa pour les résidus d'antibiotiques ont été développés (**Reig et Toldra, 2008; Jenster et al. 1992**).

Elle est cependant dépourvue des inconvénients liés à l'utilisation de la radioactivité.

3.2.4.3. Méthodes chromatographiques

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie liquide ultra performance (UPLC) sont les méthodes chromatographiques les plus utilisées. Ces méthodes physico-chimiques sont basées sur l'extraction et la purification des antibiotiques à partir des tissus ou des liquides comme le lait (**Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999**).

De ce fait, la séparation de composés en solution élués s'effectue à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide percolée grâce à une pression élevée. Effectivement, il existe une réelle interaction triple entre l'analyte, la phase stationnaire et la phase mobile basée sur l'affinité physico-chimique entre les trois (**Boultif, 2015**).

3.2.4.3.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Couplé à un système d'injection des échantillons à analyser et à un système de détection en continu au sein d'un chromatographe, un tel système de séparation permet des analyses fines d'une grande qualité dans la mesure où les différents constituants des mélanges sont séparés avant d'être déterminés quantitativement. Les techniques de chromatographie liquide sont en plein essor pour le contrôle en laboratoire grâce à la possibilité d'automatisation (injection, élution, nettoyage de la colonne, détection) (Figure 6). L'utilisation assistée par ordinateur pour le traitement des données réduit le temps nécessaire pour le traitement d'un échantillon (Caude et Jardy, 2001).

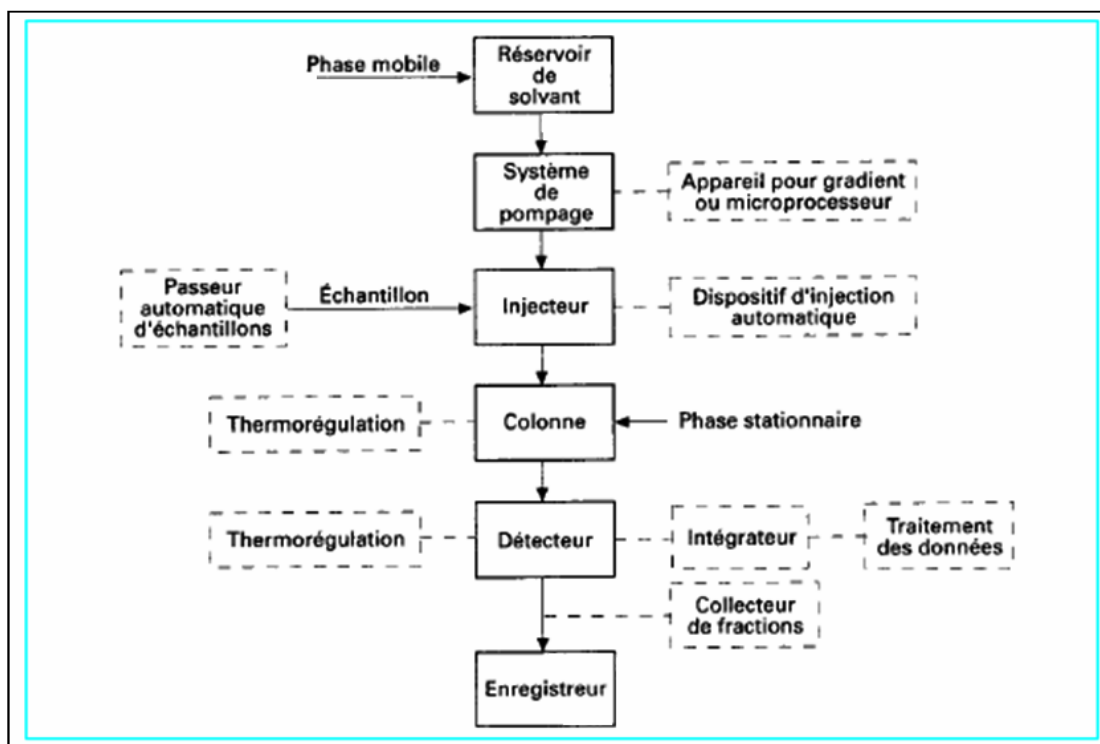


Figure 6 : Principe d'un chromatographe en phase liquide (Caude et Jardy, 2001).

L'utilisation des étalons de concentrations connus permet d'identifier et de quantifier les composants d'un échantillon (Caude et Jardy, 2001).

- L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétentions obtenus pour l'échantillon et pour les étalons. Le temps de rétention (t_R) est le temps d'élution au sommet du pic, mesuré à partir de l'injection.
- Le dosage s'effectue grâce à la mesure puis la comparaison de l'aire du pic d'élution de la substance de référence (étalon) à celle du produit à analyser.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été choisie comme méthode analytique pour confirmer la présence d'antibiotiques appartenant à plusieurs familles dans divers échantillons (viandes blanche et rouge, foie, rein...) (**Abiola et al., 2005**), ont utilisé cette méthode pour confirmer la présence de tétracycline, de sulfamides, de nitrofuranes et de chloramphénicols dans le gésier et le foie de poulet (**Laurentie et Sanders, 2002**).

Ont ciblé les molécules suivantes dans divers matrices : ampicilline, les tétracyclines (Chlorotétracycline, oxytétracycline, tétracycline), les macrolides (Tyrosine, érythromycine, spiramycine), Chloramphenicol et hygromycine. Le traitement des échantillons passe par une phase d'extraction dont le protocole diffère d'une famille à une autre (**Lee, 2007**).

L'HPLC peut être couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM-SM) pour détecter et quantifier les résidus d'antibiotiques dans divers matrices (**Gaudin et al., 2005 ; Krebber et al., 2006; Kunihiro et Kishida, 2007**).

3.2.4.3.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans la CCM classique, la solution d'échantillon à analyser est déposée à l'aide d'un capillaire ou d'une seringue à une petite distance (1 cm en général) de l'extrémité de la couche. On peut donc parler d'une injection latérale à la différence de l'injection centrale réalisée sur colonne. Le volume déposé est très faible (1 à 5 μL). La tache (ou spot) ainsi obtenue doit être aussi circulaire et petite que possible. La plaque est ensuite placée dans une cuve à développement contenant le solvant (ou le mélange de solvants) constituant la phase mobile et saturée par ses vapeurs. La phase mobile monte par ascension capillaire entraînant ainsi l'échantillon déposé. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des interactions retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. La détection des substances est une opération distincte de la chromatographie et elle s'effectue sur une couche séchée et débarrassée du solvant de développement par pulvérisation d'un réactif révélateur donnant des dérivés colorés avec les composants du mélange. L'identification s'effectue grâce à la comparaison des distances de migration obtenues pour les composants du produit à analyser et pour des étalons Co-migrés dans les mêmes conditions (**Siouffi et al., 2002**).

3.3. Méthodes de confirmation

Les méthodes de dépistage doivent être complétées par des méthodes de confirmation qui sont appliquées sur les échantillons détectés positifs par les méthodes de dépistage. Les méthodes de confirmation doivent identifier sans ambiguïté la molécule de résidu et doivent pouvoir la quantifier à un niveau au moins deux fois inférieur à la LMR. La procédure complète pour une analyse de confirmation est coûteuse en temps, en équipements et en produits réactifs. De plus, elle nécessite un personnel formé avec un bon degré d'expertise **(Reig et Toldra, 2007)**.

Les méthodes de confirmation sont aujourd'hui des méthodes physico-chimiques, la confirmation des échantillons positifs se fait au moyen de méthodes analytiques comme :

- La chromatographie liquide haute performance avec ionisation électro-spray à pression atmosphérique (HPLC-ESI) associée à la spectrométrie de masse (SM) **(Laurentie et al., 2002)**. C'est la technique de choix pour identifier et doser le chloramphénicol par exemple **(Reig et Toldra, 2007)**.
- L'HPLC-SM avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI en anglais) **(Combs et al., 1999; Delepine et al., 2002; Reig et Toldra, 2007)**.

La chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse en tandem est utilisée depuis le début de l'année 2002 par le laboratoire national de référence pour la confirmation des échantillons trouvés positifs par les méthodes microbiologiques dans le cadre du programme de contrôle des résidus d'antibiotiques mis en place par la DGAI. Cette technique est également utilisée pour la confirmation des échantillons détectés positifs dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle des substances interdites telles que le chloramphénicol et les nitroimidazolés. Des développements sont également en cours au laboratoire national de référence, pour des substances interdites telles que les nitrofuranes (Tableau 6) **(Delepine et al., 2002)**.

Tableau 6 : Analyses de laboratoires pratiquées dans le contrôle des résidus d'antibiotiques (DGPA ; 2015).

Analytes Recherchés	Risque pour le consommateur	Législation	Screening		Confirmation	
			Méthode	Laboratoire	Méthode	Laboratoire
Chloramphenicol	Aplasia médullaire	Substances Interdites	LC/MS/MS	INRAP	LC/MS/MS	ANSES, France
Nitrofurannes, Nitroimidazoles	Mutagène - Cancérigène					
Pénicillines Céphalosporines Macrolides Tétracyclines Sulfamides Aminoglycosides Quinolones	Allergie	Antibiotiques autorisés, usage raisonné	Premitest Screening	LDA Dordogne	HPLC	ANSES, France
				IRVT		

CONCLUSION

Les matrices alimentaires d'origine animale (lait, viande, œufs, miel, etc) sont susceptibles de contenir des résidus de médicaments vétérinaires et plus particulièrement des résidus d'antibiotiques suite à des traitements préventif ou curatif sur des animaux. Les résidus sont définis comme des substances pharmacologiquement actives, persistant dans les denrées alimentaires après l'administration à un animal (principe actif, métabolite, excipient, etc) et pouvant présenter un danger pour la santé humaine.

Il convient donc de s'interroger sur les risques qu'encourent les consommateurs vis-à-vis de cette présence qui peut conduire à un développement des réactions allergiques chez certains individus hypersensibles, à l'émergence de la résistance bactérienne, à la perturbation dans la composition de la flore digestive, à l'augmentation du risque de la carcinogénicité jusqu'à la toxicité aigüe pouvant causer la mort (cas du chloramphénicol).

En Algérie, un mauvais usage des antibiotiques peut être constaté; par conséquent, il est urgent que tout ceux qui sont impliqués dans le geste thérapeutique prennent conscience de ce problème et contribuent chacun de son côté à préserver l'arsenal antibiotique disponible.

RECOMMANDATIONS

La plus part de denrées alimentaires d'origine animale échappe à tout control hygiénique et sanitaire, elles peuvent contenir des résidus d'antibiotiques, néfaste pour la santé du consommateur et pour la transformation. Pour minimiser les accidents de ces derniers, nous recommandons:

- L'identification des animaux traités.
- L'observance des prescriptions délivrées par son vétérinaire en respectant strictement les posologies, les voies d'administration et les temps d'attentes indiqués sur l'ordonnance.
- Etablir une prescription, systématique et rationnelle, pour tout traitement délivré. L'ordonnance, qui matérialise cette prescription, doit indiquer clairement l'animal concerné, le mode d'emploi de chaque médicament, la dose, la durée d'administration, et les délais d'attentes.
- Limiter les usages hors AMM (Autorisation de la Mise sur Marché) des médicaments.
- Préconiser des temps d'attentes plus longs, lors d'usage hors AMM.
- Bien raisonner la voie de traitement.
- Toutes les denrées alimentaires d'origine animale doivent subir un control systématique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Barbut F., Petit J.C. 2007.** Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques, dans infectiologie par: Collignon A., Leymarie M. B., Farinotti R., Doutremepuich C, 3^{ème} édition, 346-362.
2. **Ben-Mahdi M., Ouslimani S. 2009.** Mise en évidence des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois, European Journal of Scientific Research, 36 (3): 357-362.
3. **Berche, P., Louis, J., et Limonet, M., 1991.** Bactériologie: les bactéries des infections humaines, Éd. Médecine Sciences, Flammarion, Paris.
4. **Bergogne-Berizin, E., et Dellamonica, P., 1999.** Antibiothérapie en pratique Clinique, 2^{ème} édition, Masson : 496.
5. **Bezoen, A., Van Haren, W., et Hanekamp, J.C., 1999.** Human Health and Antibiotic Growth Promoters (AGPs): Reassessing the Risk. Heidelberg Appeal Nederland studies.
6. **Bories, G., et Louisot, P., 1998.** Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale, rapport effectué par le président de la Commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale et la président du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Conseil supérieur d'hygiène publique de France : 3-21.
7. **Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., 2011.** Analysis of antimicrobial agents in animal feed, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30 (7): 1042-1064.
8. **Boultif, L., 2015.** Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC), thèse de Doctorat: Université Mentouri Constantine, Algérie, 156.
9. **Bourin, M., Michel, L., et Allain, H., 1994.** Médicaments–Antibiotiques. Traité de Chimie Thérapeutique. Vol 2. Cours de Pharmacologie 3^{ème} Edition.
10. **Bryskier, A., 1999.** Agents antibactériens et antifongiques, Paris : Ellipses; 1216p.

11. **Cartier, P., 2007.** Le point sur la qualité des carcasses et des viandes de gros bovins
Compte rendu final n° 17 05 32 022 Institut de l'Élevage département Techniques
d'Élevage et Qualité Service Qualité des Viandes p 67.
12. **Caude, M., et Jardy, A., 2001.** Méthodes chromatographiques : introduction,
Technique d'ingénieur, PE 1 445- (1-6).
13. **Cauty, I., et Pereau, J., 2003.** La conduite du troupeau laitier. Edt: France, Agricole,
p62.288.
14. **Chambers H.F., Sande M.A, 1998.** Médicaments antimicrobiens: Considération
générales, dans les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments par
Goodman et Gilman, 9ème édition, McGraw-Hill : 1027-1068.
15. **Châtaigner, B et Stevens, A., 2003.** Investigation sur la présence de résidus
d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à DAKAR, Institut Pasteur de DAKAR,
Projet PACEPA p 12.
16. **Chataigner, B., 2004.** Etude de la qualité sanitaire des viandes bovines et ovines à
Dakar (Sénégal), Contamination par des résidus d'antibiotiques, Thèse de Doctorat
vétérinaire, Toulouse, n°4019, 103p.
17. **Chatellet . M-C ; 2007.** Modalité d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin:
enquête en Anjou. Thèse doctorat vétérinaire Al fort.
18. **Clive, P.P., Curtis, M.J., Walker, M.J., Sutter, M.C., Hoffman, B.B., 1999.**
Pharmacologie intégrée traduction de la première édition anglaise par Georges C.,
avec collaboration de Jacques D., De BOECK Université : 606.
19. **Combs M.T., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. 1999.** HPLC/atmospheric pressure
chemical ionization - mass spectroscopy of eight regulated sulfonamides *J. Pharm.*
Biomed. Anal., 19, (3-4), p301-308.
20. **Delepine B., Hurtaud-Pessel D., Sanders P. 2002.** Les méthodes récentes d'analyse
physico-chimique des résidus d'antibiotiques dans le lait *Bulletin des Groupements*
Techniques Vétérinaires, 15, p191-196.
21. **DGPA, 2015.** Annuaire Statistiques de la Direction Générale de la Pêche et de
l'Aquaculture, Ministère de l'Agriculture, Tunisie
22. **Diop, 2003.** Etude des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits aviaires
de la zone des Niayes (Sénégal). Thèse: Méd. Vét., Dakar, n°17.

23. **Duval J et Soussy C J, 1985.** Abrég d'antibiothérapie. Paris: Masson, 180p .
24. **Duval J et Soussy C, 1990.** Antibiothérapie, collection abrégés, Masson, paris.
25. **Dziedzic. E, 1988.** Les résidus de médicaments vétérinaires anthelminthiques, Thèse de Doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon n°99, 192 p.
26. **Enriquez B.J., Boulouis H.J ; 1990.** Pharmacocinétique des anti-infectieux Rec. Méd. Vét., 166, (3), p205-223.
27. **Errecalde, J.O., 2007.** Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, p 1-67.
28. **Fabre J.M., Moretain J.P., Berthelot X. 2002.** Evolution de la méthode
29. **Fabre, J.M., Mircovich, C., Geijp, E., Moretain, J.P., Beneteau, E., Martineau, G.P., 2004.** Résidus d'antibiotiques dans la viande de porc et de volaille en France : situation actuelle et évaluation d'un nouveau test de détection Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires, 23, p21-25.
30. **FAO/OMS, 1990.,** Evaluation des résidus de certains médicaments vétérinaires dans les aliments. Trente-sixième rapport du comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires. Genève; 76p.
31. **Fergusson, J.P., Baxter, G.A., Mac, Evoy, J.D.G., Stead, S., Rawling, E., Sharman, M., 2002.** Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor The Analyst, 127, p951-956.
32. **Fiscus-mougel, F., 1993.** Les résidus d'antibiotiques à usage vétérinaire dans le lait et la viande. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Claude Bernard, Lyon, p53, 84.
33. **Fontaine. M., 1992.** Vade-mecum du vétérinaire, formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène », 15ème édition, page 106 119. Volume1.
34. **Gaudin, V., Fabre, J.M., Rault, A.** Rapport_Etude_préliminaire, AFSSA, doc.090206, France.
35. **Gauthier, E., 2001.** les antibiotiques : l'envers du miracle, <http://agora.gc.ca/mot.nef/dossiers/antibiotique>. (consulte le 03-02-2008).

36. **Guillemot, D., 2006.** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, page 10-214. (AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).
37. **Jenster, G., Van der kor put, J.A., et Trapman, J., et Brinkmana, O., 1992.** Functional domains of the human androgen receptor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 41, 671-675. Ministère de la Santé <http://ead.univangers.fr/%7Ejaspard/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOG>.
38. **Kirkpatrick, D., 2002.** L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation: les conséquences pour la résistance et la santé humaine, page 17-229.
39. **Klotins, K., 2006.** Utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance: controverse et solutions
40. **Kölbener P, Diserens J M, Känzig A, Jaus A, Hochstrasser K, Kaufmann A, Doering T, Reber S, Edder P, Kaufmann T, LeuenbergerU, Noser J, zehringerM et Gremaud G. 2005.** Résidus de médicaments vétérinaires, 1ere édition, p 2.
41. **Krebber. R, Hoffend. F.J and Ruttman. F.,** Development - Residues, Operator and Consumer Safety, Germany Bayer Crop Science AG , Alfred-Nobel-Str. 50, 40789.
42. **Labie, C., 1982.** Actualités et réalités du problème des résidus dans les denrées alimentaires d'origine Animale 2nd Entretien de Bourgelat, ENVL, 21-23 octobre 1982, Edition du Point vétérinaire, (2), p149-160.
43. **Larpent, J.P et Sanglier, J., 1989.** Biotechnologie des antibiotiques. Paris : Masson, 481p.
44. **Laurentie, M., et Sanders, P., 2002.** Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait, *Bull. Group. Tech. Vét.*, (15), 197-201.
45. **Le Chat., 2007,** Pharmacologie, Service de pharmacologie Université Paris », VI. Édition DCEM, p307.
46. **Le Minor L., 1982.** Bactériologie médicale, édition: Flammarion médecine-sciences, 773.
47. **Lee, J.B., 2007.** Development of an analytical protocol for detecting antibiotic résiduels in variou foods, *Food Chemistry*, 105, 1726–1731.

48. **Leitner, A., Zöllner, P., et Lindner, W., 2001.** Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 2001, 939, (1-2), p49-58.
49. **Lopry, J.R., Carret, G., and Flandrois, J.P., 1992.** Maintenance requirement of *Escherichia coli* ATCC-25922 in the presence of sub inhibitory concentration of various antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother* 29:2, p121-127.
50. **Maghuin M., 2002.** Hormones, substances anabolisantes et résidus de traitements vétérinaires en relation avec la sécurité alimentaire In: *Sécurité alimentaire du consommateur* », 2^{ème} . Ed. TEC & DOC, Lavoisier. p 65-91.
51. **Maghuin-Rogister, G., Janosi, A., Helbo, V., Van Peteghem, C., Sanders, E., Van Eeckhout, N., Cornelis, M., Jouret, M., 2001.** Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires 27 -59. Rapport Final SSTC 1998-2001.
52. **Maillard, R., 2002.** Antibiothérapie respiratoire, *La Dépêche Vétérinaire*, 80 : 15-17.
53. **Milhaud, G., et Person, J.M., 1981.** Evaluation de la toxicité des résidus d'antibiotiques dans le lait. *Rec- Méd – Vét*, 157 (2): 179 – 185 Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2006, 214p.
54. **Milhaud. G ; 1978.** L'utilisation rationnelle des médicaments vétérinaires et le temps d'attente, page 177-185. *Rec. Méd. Vét.*, 154 (2) ,177-185. École vétérinaire d'ALFORT(France).
55. **Muller, L.M., 1995.** Méthode de prédiction des aptitudes de croissance des populations de microorganismes. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon, 1995.
56. **Neuman, M., 1979.** Vademecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux. 4^{ème}. Ed. Maloine. Paris. p114.
57. **Puyt, J.D, et Sachot, E., 2001.** Résidus médicamenteux: les différents calculs du temps d'attente, *Le point Vétérinaire* N°212(32) 48-51.
58. **Rasmussen, 1970.** Le Médicament vétérinaire.
59. **Reig M., Toldra F., 2008.** Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection, *Meat Science*, 78 (1-2): 60-67.

60. **Saux A , (2006)**. Pharmacocinétique et modalité d'administration des antibiotiques. Laboratoire de Pharmacocinétique et de Pharmacie Clinique EA 525 Université V. Segalen Bordeaux 2 et Pharmacie centrale hôpital Haut - Lévêque CHU de Bordeaux », 7èmes JNI 08.06.06, p3.
61. **Scippo, M.L, 2008**. Introduction à la qualité et la sécurité des aliments : aspects chimiques, 1er Master Méd. Vét VETE1023-1, Faculté de médecine vétérinaire, université de Liège 8- 32.
62. **Sharmen, B., 2001**. Improvement to the screening of antimicrobial drug residues in food by the use of Premi Test. Veterinary Science: Vol. 70.
63. **Siouffi, A.M., Postaire, E., et Pradeau, D., 2002**. Chromatographie planaire, Technique d'ingénieur PE1 475- (1-25).
64. **Stoltz, R., 2008**. thèse sur les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale. École nationale vétérinaire de lyon.
65. **Talnan, A., 2013**. Contrôle des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées
66. **Vanderwaaij, D., 1992**. History of recognition and measurement of colonization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastrointestinal de contamination", epidemiol. Infect. pl09, p3, p315-326.
67. **Wang J., Leung D., Lenz S.P. 2006**. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 2873–2880.