



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI DE CONSTANTINE  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**

... /DS/2018  
.../vét/2018

**THESE PRESENTEE EN VUE  
DE L'OBTENTION DU DOCTORAT EN SCIENCES  
Option : Hygiène des denrées alimentaires d'origines animales  
Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire des denrées  
alimentaires d'origine animale**

***DETECTION ET QUANTIFICATION PAR  
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)  
DE QUELQUES ANTIBIOTIQUES UTILISES EN APICULTURE EN  
ALGERIE  
« Etude comparative de résidus détectés sur des échantillons de  
miel local et de miel importé »***

Présentée par

**CHEBIRA Bessam**

**Membres du jury :**

EL GROUD Rachid	Président	M. C. A	Univ. Des frères Mentouri	Const
AGABOU Amir	Examineur	M. C. A	Univ. Des frères Mentouri	Const
ADAMOUCHE Abd El Kader	Examineur	Professeur	Univ. Ouargla	
ARBOUCHE Rafik	Examineur	M. C. A	Univ. Ghardaia	
MEKROUD Abdeslam	Dir. de thèse	Professeur	Univ. Des frères Mentouri	Const

Année universitaire 2017-2018

# Remerciements

Toute ma gratitude va au bon dieu, qui ma donner la force et la volonté pour que ce travail voit la lumière du jour.

Je suis très reconnaissant à Mr. Abdeslam MEKROUD, qui n'était pas seulement mon promoteur, loin de ça, je l'ai toujours considéré comme un père qui a toujours été là pour me conseiller et me guider afin de passer tous les obstacles qui nous ont rencontrés tout au long de cette expérience.

Un remerciement spécial aux membres de jury :

Mr. EL GROUD Rachid président de jury, Mr. ADAMOU Abd El Kader, Mr. ARBOUCHE Rafik et Mr. AGABOU Amir (membres du jury), Pour le temps et la patience qu'ils ont consacrés à examiner mon document ainsi que pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Un grand remerciement à toute l'équipe du laboratoire « PADESCA » spécialement : Latifa, Amir, Mme. CHOUDER, Saber, Mohamed el cherif, samir.

Merci à tous les enseignants, qui n'ont ménagés aucun effort pour nous transmettre une parcelle de leur savoir, je leur serais toujours reconnaissant.

A mes amis : Brahim, Faycel et Moundji qui ont apportés leur contribution à ce travail chacun à sa façon.

Evidemment je ne pourrais remercier tout le monde, alors un remerciement spécial à tout ceux que j'ai connus et je connais. Merci pour toute votre aide

# DEDICACES

*A ma mère et mon père les deux êtres les plus cher à mon cœur.*

*A tous mes frères et sœurs que j'aime tant : Zohair et sa femme souad,*

*Sofiane et son épouse radhia, Selma et mon petit Midou.*

*A mes amis : Mehdi et Mehdi et Farouk que leurs soutiens à toujours*

*était un réconfort dont je ne pouvais m'en passer.*

# *Dédicace spécial*

*A notre regretté et cher Professeur EL HADEF EL OKKI Saadoune, qui a toujours cru à nos capacités et resté toujours le meilleur exemple à suivre dans les moments les plus difficiles et jusqu'à ces derniers jours.*

*Pour moi tu es resté ce père affectueux et aimant que je n'oublierai jamais tant que je vivrai sur cette terre. A ton honneur je dédie ce travail qui est le fruit de vos enseignements.*

# *Dédicace spécial*

*Je garde le meilleur pour la fin, le proverbe dit : « derrière tout grand homme, il y'a toujours une femme » de ma part tous les mots qui peuvent exister sur cette terre ne pourrons jamais exprimer ma gratitude à la femme la plus extraordinaire que j'ai rencontré dans ma vie, la lumière qui éclaircissait mes moments les plus sombres et les plus difficiles. Merci ma chère pour tout ce que tu as fait et ce que tu fais encore et ce que tu en feras dans l'avenir pour moi.*

*A mes petits amours AHMED et MOHAMED qui sont la joie de ma vie*

## **TABLE DES MATIERES**

### ***Introduction générale***

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Premier chapitre : généralités et rappel sur les antibiotiques**

<b>1. DEFINITION</b>	<b>1</b>
<b>2. IMPORTANCE</b>	<b>2</b>
<b>3. HISTORIQUE</b>	<b>3</b>
<b>4. MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>4</b>
<b>5. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>5</b>
<b>5.1 CRITERES DE CLASSIFICATION</b>	<b>5</b>
<b>5.1.1. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LEUR ORIGINE</b>	<b>5</b>
<b>5.1.1.1. FERMENTATION OU EXTRACTION</b>	<b>6</b>
<b>5.1.1.2. SEMI-SYNTHESE</b>	<b>7</b>
<b>5.1.1.3. SYNTHESE CHIMIQUE TOTALE</b>	<b>8</b>
<b>5.1.2. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LA STRUCTURE CHIMIQUE</b>	<b>8</b>
<b>5.1.3. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LA CIBLE BACTERIENNE</b>	<b>9</b>
<b>5.1.3.1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne</b>	<b>9</b>
<b>5.1.3.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cellulaire cytoplasmique bactérienne</b>	<b>10</b>
<b>5.1.3.3. Antibiotiques agissant au niveau des ribosomes</b>	<b>10</b>
<b>5.1.3.4. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques</b>	<b>11</b>
<b>5.1.3.5. Antibiotiques agissant par d'autres mécanismes</b>	<b>11</b>

<b>5.4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LE SPECTRE D'ACTIVITE</b>	<b>11</b>
<b>5.5 CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES PAR FAMILLE</b>	<b>12</b>
<b>6. PHARAMACOCINETIQUE DES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>12</b>
<b>6.1. ABSORPTION</b>	<b>12</b>
<b>6.2. DISTRIBUTION</b>	<b>13</b>
<b>6.3. TRANSFORMATIONS</b>	<b>14</b>
<b>6.4. EXCRETION</b>	<b>14</b>
<b>7. PRINCIPAUX EFFETS INDESIRABLES DES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>14</b>
<b>8. USAGES DES ANTIBIOTIQUES EN MEDCINE VETERINAIRE</b>	<b>15</b>

**Deuxième chapitre : production et qualité du miel**

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>2. DEFINITION</b>	<b>17</b>
<b>3. DESCRIPTION</b>	
<b>4. PRODUCTION DU MIEL</b>	<b>17</b>
<b>5. TYPES DE MIEL</b>	<b>18</b>
<b>5.1. MIELS MONO FLORAUX</b>	<b>19</b>
<b>5.2. MIELS POLY FLORAUX</b>	<b>19</b>
<b>6. PROPRIETES</b>	<b>20</b>
<b>6.1. PROPRIETES DIETETIQUES</b>	<b>21</b>
<b>6.2. PROPRIETES THERAPEUTIQUES</b>	<b>21</b>
<b>7. CONTROLE DU MIEL</b>	<b>22</b>
<b>8. CRITERES DE QUALITE SPECIFIQUES</b>	<b>23</b>
<b>8.1. TENEUR EN EAU</b>	<b>24</b>
<b>8.2. TENEUR EN SUCRES REDUCTEURS ET SACCHAROSE APPARENT</b>	<b>24</b>
<b>8.3. TENEUR EN SUBSTANCES INSOLUBLES DANS L'EAU</b>	<b>25</b>
<b>8.4. TENEUR EN SUBSTANCES MINERALES (CENDRES)</b>	<b>24</b>
<b>8.5. ACIDITE</b>	<b>25</b>

<b>8.6. ACTIVITE DE LA DIASTASE</b>	<b>26</b>
<b>8.7. TENEUR EN HYDROXYMETHYLFURFURAL</b>	<b>26</b>
<b>8.8. TENEUR EN SUCRES SPECIFIQUES</b>	<b>27</b>
<b>9. FACTEUR QUALITATIF SUPPLEMENTAIRE</b>	
<b>EN DEHORS DES NORMES</b>	<b>27</b>
<b>9.1. ACTIVITE DE L'INVERTASE</b>	<b>28</b>
<b>9.2. VALEUR DU pH</b>	<b>28</b>
<b>9.3. CONTAMINATION PAR LES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>28</b>
<b>9.3.1. contamination verticale</b>	<b>28</b>
<b>9.3.2. Contamination horizontale</b>	<b>30</b>
<b>9.3.3. Méthodes utilisées pour la détection des résidus d'antibiotiques</b>	<b>32</b>
<b>9.3.4. Doses tolérables</b>	<b>34</b>

### *Troisième chapitre : résidus d'antibiotiques*

<b>1. GENERALITES</b>	<b>37</b>
<b>2. DEFINITION</b>	<b>38</b>
<b>3. ANTIBIOTIQUES EN MEDECINE VETERINAIRE</b>	<b>38</b>
<b>3.1. USAGE CURATIF</b>	<b>38</b>
<b>3.2. USAGE AU TITRE ADDITIF</b>	<b>38</b>
<b>3.3. USAGE PROPHYLACTIQUE</b>	<b>38</b>
<b>3.4. ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES AUTORISE</b>	<b>39</b>
<b>3.5. NATURE ET PROPRIETES DES RESIDUS</b>	<b>40</b>
<b>3.5.1. Résidus extractibles</b>	<b>41</b>
<b>3.5.2. Résidus non-extractibles</b>	<b>41</b>
<b>4. DELAI D'ATTENTE</b>	<b>41</b>
<b>4.1. DEFINITION</b>	<b>41</b>
<b>4.2. FIXATION DU TEMPS D'ATTENTE</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1. modalités de détermination du temps d'attente (TA)</b>	<b>42</b>
<b>5. LIMITE MAXIMALE DES RESIDUS</b>	<b>44</b>
<b>5.1. DEFINITIONS</b>	<b>44</b>
<b>5.2. FIXATION DE LA LMR</b>	<b>45</b>
<b>5.2.1. Dose sans effet</b>	<b>47</b>
<b>5.2.2. Dose journalière admissible acceptable (DJA)</b>	<b>48</b>

5.2.3. Concentration admissible	49
6. RISQUES PRESENTES PAR LES RESIDUS	49
6.1. RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE	49
6.1.1. TOXICITE DIRECTE	50
6.1.2. REACTIONS ALLERGIQUES	53
6.1.3. ACQUISITION DE RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES	54
6.1.4. PERTURBATION DE LA FLORE DIGESTIVE	54
6.1.5. Risques pour l'environnement	55

**Quatrième chapitre : méthodes de détection et de quantification des résidus  
d'antibiotiques**

1. HISTORIQUE ET EVOLUTION DES METHODES DE DETECTION	57
2. DETECTION DES RESIDUS ANTIBIOTIQUES	57
2.1. IMPORTANCE ET NECESSITE	57
2.2. TESTS DE DEPISTAGE	58
2.2.1. Delvotest®	59
2.2.2. CHARM TEST	60
2.2.3. Premi®test	61
2.3. METHODES DE CONFIRMATION	62
2.3.1. Méthode immuno-enzymatique « ELISA »	63
2.3.2. Méthodes physico-chimiques	66
2.3.2.1. Chromatographie liquide haute performance(HPLC)	66
2.3.2.1.1. Principe	67
2.3.2.1.2. Instrumentation	68
2.3.2.1.2. Analyses des chromatogrammes	72
2.3.2.1.5. Avantages de la chromatographie liquide haute Performance	73
2.3.2.1.6. Domaines d'application de l'HPLC	74

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

1.	Objectifs	75
2.	Localisation spatio-temporelle de l'étude	76

### **PREMIERE PARTIE : DETECTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE MIEL PAR LA MEHODE DE SCREENING PEMITEST**

1.	INTRODUCTION	77
2.	MATERIELS & METHODE	78
2.1.	MATERIELS	78
2.1.1.	Matériels utilisés pour la méthode de screening (Premi®test)	78
2.2.	METHODE	80
2.2.1.	Détection des résidus d'antibiotiques par la méthode Premi®test	80
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	86
3.1.	Mesures du pH	86
3.1.1.	Résultats de l'analyse PREMI®TEST	87
3.1.2.	Analyse statistique	94
3.3. 3.1.	<u>Résultats de l'analyse statistique</u>	95
3.1.3.	Discussions	96
	<u>Conclusion de la première partie</u>	100

**DEUXIEME PARTIE : MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION  
DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE MIEL PAR  
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) EN  
PHASE INVERSE**

INTRODUCTION	102
--------------	-----

**Chapitre premier : choix de la méthode d'analyse HPLC**

1. CHOIX DES ANTIBIOTIQUES	104
2. CHOIX DE LA METHODE D'ANALYSE	105

**Deuxième chapitre : optimisation des paramètres d'analyse HPLC pour la  
détection des résidus d'antibiotiques dans le miel**

1. MATERIELS ET METHODE	108
1.1. MATERIELS UTILISES POUR LA METHODE CHROMATOGRAPHIQUE (HPLC)	108
1.1.1. Modules HPLC	108
1.1.2. Supports informatiques	109
1.1.3. DISPOSITIF DE FILTRATION (SUPELCO.Cat.58061 & 58062U)	110
1.1.4 Petits matériels	110
1.1.5. Produits chimiques et standards	110
1.2. PROTOCOLE GENERAL D'ANALYSE	112
1.2.1. Procédure générale d'analyse HPLC	112
1.2.2. Étalonnage du système HPLC	115
1.2.3. Optimisation des paramètres de l'analyse HPLC	115
2. RESULTATS ET DISCUSSION	116
2.1. ETALONNAGE DU SYSTEME HPLC	117
2.2. OPTIMISATION DES PARAMETRES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES PAR HPLC	119
2.2.1. Paramètres retenus pour l'analyse HPLC de la streptomycine	119
2.2.2. Paramètres retenus pour l'analyse HPLC du chloramphénicol	121

**Troisième chapitre : validation de la méthode d'analyse HPLC**

<b>1.</b>	<b>PROCEDURE DE VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE HPLC</b>	<b>127</b>
<b>1.1.</b>	<b>FIDELITE</b>	<b>128</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>La répétabilité</b>	<b>128</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>Précision intermédiaire (fidélité intermédiaire)</b>	<b>128</b>
<b>1.2.</b>	<b>LINERARITE</b>	<b>130</b>
<b>1.3.</b>	<b>ÉTABLISSEMENT DE LA LIMITE DE DETECTION D'UNE METHODE(LDM)</b>	<b>131</b>
<b>1.3.2.</b>	<b>Calcul de la limite de détection de la méthode (LDM)</b>	<b>131</b>
<b>1.4.</b>	<b>ETABLISSEMENT DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION DE LA METHODE(LQM)</b>	<b>132</b>
<b>1.4.2.</b>	<b>Calcul de la limite de quantification de LA METHODE (LQM)</b>	<b>132</b>
<b>1.5.</b>	<b>MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EXTRACTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES A PARTIR DU MIEL</b>	<b>133</b>
<b>1.5.1.</b>	<b>Effet matrice (EM) dans une analyse quantitative HPLC</b>	<b>134</b>
<b>2.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>136</b>
<b>2.1.</b>	<b>VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE HPLC</b>	<b>136</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Fidélité</b>	<b>136</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Vérification de la linéarité</b>	<b>144</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Limite de détection et de quantification de la méthode d'analyse HPLC</b>	<b>149</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>ESSAIS D'EXTRACTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES</b>	<b>150</b>
<b>2.1.4.1.</b>	<b>Vérification de l'effet matrice</b>	<b>154</b>
	<b><u>CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE</u></b>	<b>156</b>
	<b><u>LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>157</b>
	<b><u>LISTE DES TABLAUX</u></b>	<b>191</b>
	<b><u>LISTE DES FIGURES</u></b>	<b>192</b>
	<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b>	<b>193</b>

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau N° 1 : répartition des échantillons</b>	<b>p 79</b>
<b>Tableau N° 2 : <i>Seuils</i> de détectabilité des principales familles d'antibiotiques par le Premi®Test par rapport aux LMRs dans le muscle (AFNOR, 2006)</b>	<b>p 80</b>
<b>Tableau N° 3 : nombre d'échantillons positifs et négatifs révélés par l'analyse Premi®test</b>	<b>p 89</b>
<b>Tableau N° 4 : représentant les proportions obtenues après analyse des échantillons par Premi®test</b>	<b>p 94</b>
<b>Tableau N° 5 : résultats de l'analyse statistique par le test Z pour deux proportions indépendantes</b>	<b>p 95</b>
<b>Tableau N° 6 : paramètres retenus pour l'analyse HPLC de la streptomycine</b>	<b>p 119</b>
<b>Tableau N° 7 : paramètres retenus pour l'analyse HPLC du chloramphénicol</b>	<b>p 122</b>
<b>Tableau N° 8 : paramètres retenus pour l'analyse HPLC de l'oxytétracycline</b>	<b>p 124</b>
<b>Tableau N° 9 : Critères de validation d'une méthode analytique</b>	<b>p 127</b>
<b>Tableau n° 10 : concentrations des standards antibiotiques correspondant aux différents niveaux de la gamme d'étalonnage</b>	<b>p 130</b>
<b>Tableau N° 11 : échantillon de miel dopé aux standards antibiotiques</b>	<b>p 134</b>
<b>Tableau N°12: résultats statistiques de la vérification de la Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol</b>	<b>p 136</b>
<b>Tableau N°13 : résultats statistiques de la vérification de la Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol</b>	<b>p 137</b>
<b>Tableau N°14 : résultats statistiques de la vérification de la Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol</b>	<b>p 138</b>
<b>Tableau N° 15: résumé de l'étude statistique de la reproductibilité de la méthode d'analyse HPLC pour le standard streptomycine</b>	<b>p 138</b>
<b>Tableau N°16 : résultat du test T de student de comparaison des moyennes pour la streptomycine</b>	<b>p 140</b>
<b>Tableau N°17: résumé de l'étude statistique de la reproductibilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol</b>	<b>p 140</b>
<b>Tableau N°18 : résultat du test T de student de comparaison des moyennes le chloramphénicol</b>	<b>p 142</b>
<b>TableauN°19 : résumé de l'étude statistique de la reproductibilité de la méthode d'analyse HPLC de l'oxytétracycline</b>	<b>p 142</b>

<b>Tableau N°20 : résultat du test T de student de comparaison des moyennes pour l'oxytetracycline</b>	<b>p 144</b>
<b>Tableau N°21: valeurs des pics proportionnelles à la concentration d'échantillons de streptomycine</b>	<b>p 144</b>
<b>Tableau N°22: valeurs des pics proportionnelles à la concentration d'échantillons de chloramphénicol</b>	<b>p 146</b>
<b>Tableau N°23: valeurs des pics proportionnelles à la concentration d'échantillons de l'oxytetracycline</b>	<b>p 147</b>
<b>Tableau N°24: valeurs calculées de la limite de détection et de quantification (LOD/LOQ) de notre méthode d'analyse HPLC pour les résidus de streptomycine, chloramphénicol et oxytetracycline</b>	<b>p 149</b>
<b>Tableau N°25 : résultats obtenus des essais d'extraction des résidus d'antibiotique à partir du miel</b>	<b>p 154</b>
<b>Tableau N°26 : résultats obtenus lors de la vérification de l'efficacité du processus d'extraction des résidus d'antibiotique à partir du miel</b>	<b>p 155</b>

## ***Liste des figures***

<b>Figure N°1: principe du Premi®test (source: R-BIOPHARM, 2011)</b>	<b>p 85</b>
<b>Figure N° 2 : les différents virements de couleur lors d'analyse « Premi®Test »</b>	<b>p 88</b>
<b>Figure N° 3 : graphique des pourcentages des échantillons positifs, négatifs et à la limite de détection sur un total de 115.</b>	<b>p 90</b>
<b>Figure N° 4: graphique des pourcentages des échantillons de miel local, positifs, négatifs et à la limite de détection sur un total de 58.</b>	<b>p 91</b>
<b>Figure N°5 : graphique des pourcentages des échantillons de miel importé, positifs, négatifs et à la limite de détection sur un total de 57</b>	<b>p 92</b>
<b>Figure N° 6 : graphique représentant les résultats de la comparaison entre miel importé et miel local</b>	<b>p 93</b>
<b>Figure N° 7: chromatogramme de l'analyse du standard PHYWE avec les paramètres optimisés</b>	<b>p 119</b>
<b>Figure N° 8 : chromatogramme de l'analyse du standard chloramphénicol avec les paramètres optimisés</b>	<b>p 122</b>
<b>Figure N° 9 : chromatogramme de l'analyse du standard oxytétracycline avec les paramètres optimisés</b>	<b>p 125</b>
<b>Figure N°10 : courbe d'étalonnage de la streptomycine</b>	<b>p 145</b>
<b>Figure N°11 : courbe d'étalonnage du chloramphénicol</b>	<b>p 146</b>
<b>Figure N°12 : courbe d'étalonnage de l'oxytétracycline</b>	<b>p 148</b>
<b>Figure N°13 : chromatogramme obtenu par une analyse de miel dopé par le standard streptomycine</b>	<b>p 150</b>
<b>Figure N°14 : chromatogramme obtenu par une analyse de miel dopé par le standard chloramphénicol</b>	<b>p 151</b>
<b>Figure N°15: chromatogramme obtenu par une analyse de miel dopé par le standard oxytétracycline</b>	<b>p 152</b>
<b>Figure N°16 : chromatogramme obtenu par une analyse d'échantillons de miel témoin</b>	<b>p 153</b>

## ***Liste des abréviations***

**AFNOR** : Agence Française de Normalisation

**AMM** : autorisation de mise sur le marché

**ELISA**: Enzyme-Linking Immunosorbent Assays

**FDA**: Federal Drug Agency

**FSSA** : Fédération Suisse de Sécurité Alimentaire

**GC-MS**: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

**LC-MS**: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

**LMR** : Limites Maximales de Résidus

**MSDA** : Manuel suisse des denrées alimentaires

**PADESCA** : laboratoire de Pathologies animales, développement des élevages et surveillance de la chaîne alimentaire

**PPB** : particules per billion

**UE**: Union Européenne

## ***Introduction générale***

Dans le monde entier et pendant des milliers d'années, les humains dans toutes les sociétés avaient utilisé des produits d'abeille et particulièrement le miel. Ce produit naturel contient environ 200 phytosubstances et davantage de constituants bioactifs comme des composés phénoliques, des flavonoïdes, des acides biologiques, des métabolites d'acide nitrique, l'acide ascorbique, des composés dérivés de caroténoïdes, des dérivés aromatiques, des oligoéléments, des vitamines, des acides aminés et des protéines **(GHELDOLF *et al*, 2002 ; WANG *et al*, 2011; BOGDANOV S, *et al* 2008; BERETTA *et al*, 2010)**. Il est aussi admis que c'est une denrée riche en anti oxydant tant enzymatique que non enzymatique et d'autres enzymes impliqués dans le métabolisme des glucides et de défense **(PONTOH *et al* 2002 ; BABCAN *et al* 2002)**. Cette composition riche et variée fait que le miel est utilisé dans des médicaments traditionnels et modernes comme un remède au traitement de blessures, des allergies et des troubles gastro-intestinaux. **(ETERAF-OSKOUEI and NAJAFI, 2013)**

Le miel possède une action à large spectre à l'encontre des bactéries pathogènes ainsi que ceux spoliant la nourriture **(AL-WAILI *et al*, 2004 ; EMSEN, 2007)** et une activité anti néoplasique **(SEWLLAM *et al*, 2003)**. Cependant l'utilisation de miel dans la nutrition humaine et la médecine pourrait comporter certains dangers pour le consommateur, puisqu'il peut contenir des variétés de microorganismes telles que le *Clostridium Botilunim* **(KOLUMAN *et al*, 2013)**, *Bacillus cereus* **(LOPEZ and ALIPPI, 2007)**, coliformes, *E. coli*, *S. aureus* et *Aspergillus sp* **(DUMEN *et al*, 2013)** et d'autres polluants, y compris des métaux lourds, des matières radioactives, des pesticides et des antibiotiques (principalement des: tétracycline, streptomycines, sulfonamides, érythromycine, Lincomycine, Nitrofuranes, Nitroimidazoles, Fluoroquinolones, Fumagilline, tylosine et chloramphénicol) qui sont largement appliqués aux colonies d'abeilles relativement à de fortes doses comme des agents thérapeutiques pour traiter des infections, ou à des doses subthérapeutiques comme promoteurs de croissance **(REYBROECK *et al*, 2012)**. La présence de quelques résidus d'antibiotiques ou de leurs métabolites peut engendrer des réactions toxiques chez certains consommateurs tandis que d'autres peuvent produire des réactions

d'hypersensibilité (**PAIGE *et al*, 1997**). À long terme, des dangers (en relation directe avec la longue demi-vie de résidus d'antibiotiques) incluant des effets cancérigènes et tératogènes à des doses très basses, mais aussi l'augmentation de l'émergence de résistances chez les bactéries commensales et pathogènes entraînant des difficultés de traitement des infections humaines (**AL-WAILI *et al*, 2012**).

C'est pourquoi le miel a été soumis à beaucoup de normes réglementaires mentionnées comme des Limites Maximales de Résidus ou LMRs au sein de L'union Européenne et beaucoup d'autres pays, cependant aucune LMR n'a été établie pour les antibiotiques dans le miel ce qui implique un seuil de ZÉRO tolérance des résidus de ces derniers et l'interdiction formelle de leur usage en apiculture (**MICHAUD, 2005 ; COUNCIL REGULATION 2377/90/ec 1990**).

Diverses méthodes analytiques sont utilisées pour identifier et quantifier ces résidus d'antibiotiques dans le miel. Les tests microbiologiques constituent les méthodes les plus faciles et les plus usuelles lors des contrôles de routine. Néanmoins, ces tests ont un seuil de détection faible et un nombre assez élevé de faux positifs (**GAUDIN *et al*, 2013**), ce qui à donner lieu au développement d'autres méthodes qualitatives rapides ou des tests semi-quantitatifs tels que l'Enzyme-Linking Immunosorbent Assays (ELISA), cependant les résultats de ces derniers sont sujet aux controverses et requièrent l'usage de méthodes de confirmation plus précises, plus sensibles et reproductibles basées sur la chromatographie liquide ou gazeuse combinée ou non à la spectrométrie de masse (GC-MS, LC-MS) (**LOPEZ *et al*, 2008 ; HAMMEL *et al*, 2008**).

Récemment un système de réseau d'antigène régénérable combiné à un flux injecté automatiquement a été développé pour l'identification et la quantification des dérivés d'antibiotiques dans le miel (**WUTZ *et al*, 2011**).

En 2011, la filière apicole en Algérie compte 20 000 apiculteurs et 1.5 millions de ruches produisant environ 38 000 tonnes/an de miel et produits de la ruche et une importation avoisinant les 155 000 tonnes/an de miel importé de Chine, d'Inde et d'Arabie Saoudite principalement. (**OUJDET, 2012**).

Notre pays doit consolider la réglementation en vigueur et l'appuyer par un système de contrôle qualité fiable en vue de la protection du consommateur algérien, car aucun dispositif de contrôle des résidus n'est encore visible sur le terrain. En outre, la production de miel n'a cessé d'augmenter et les médicaments vétérinaires sont de plus en plus disponibles et facilement accessibles aux éleveurs. De plus, de nouvelles méthodes de détections des résidus d'antibiotiques dans les denrées, plus rapides et tout aussi fiables ont été mises au point, à l'instar du « Premi®Test » (AFNOR, 2006). Les données ont évolué sur le sujet et il nous a donc paru nécessaire de mener une nouvelle étude en vue d'actualiser celles existantes et sensibiliser davantage le pouvoir public.

Dans ce contexte, notre travail a pour objectif la détection et la quantification des résidus d'antibiotiques dans le miel dans la région de Constantine par la mise au point de méthodes qualitatives et quantitatives.

Le présent travail s'articule autour de deux grandes parties. La première expose une revue de la littérature sur les antibiotiques, la production et la qualité du miel, les résidus d'antibiotiques et les méthodes de détection de ces résidus dans les denrées animales et d'origine animale. La deuxième partie présente d'une part le protocole expérimental, d'autre part les résultats, leur discussion et enfin les recommandations.

# **PREMIER CHAPITRE : GÉNÉRALITÉS ET RAPPEL SUR LES ANTIBIOTIQUES**

## **1. DÉFINITION**

**WAKSMAN (1944)**, a défini les antibiotiques comme étant des substances d'origine naturelle, produites par des micro-organismes, qui à très faible concentration, ont le pouvoir d'inhiber la croissance, voire de détruire des bactéries ou d'autres micro-organismes. **(PUYT. J-D, 2004) ; (ABLAINE. ML, 2004)**

Cette définition mérite quelques commentaires :

- Elle restreint les antibiotiques aux seuls composés naturels ; elle établit une distinction arbitraire avec les substances artificielles (inexistantes dans la nature), douées des mêmes propriétés biologiques, les antibactériens artificiels ou antibiomimétiques (sulfamides, nitrofuranes).
- Le terme d'antibiotiques dérive de celui d'antibiose, c'est-à-dire de l'antagonisme qui existe naturellement entre les êtres vivants ; celui-ci s'exerce grâce à certaines substances chimiques qui agissent par contact direct, les antibiotiques.
- Les antibiotiques ont la particularité d'agir à très faible concentration, de l'ordre du  $\mu\text{g/ml}$ . Ceci est permis par une très grande spécificité d'action sur certains sites cellulaires, à la différence des antiseptiques et des désinfectants.
- Les antibiotiques les plus nombreux et les plus importants en thérapeutiques exercent leurs effets sur les bactéries ; ce sont les antibiotiques antibactériens. D'autres agissent de façons spécifiques sur d'autres micro-organismes ou sur certaines cellules d'êtres pluricellulaires. **(PUYT. J-D, 2004)**

## 2. IMPORTANCE

L'importance des antibiotiques et des antibactériens de synthèse est considérable en médecine en raison de leur efficacité pour combattre les infections bactériennes humaines ou animales associées en général à une faible toxicité.

Ces médicaments ont révolutionné le pronostic d'un certain nombre de maladies autrefois incurables (tuberculose, brucellose, etc.) et largement contribué à l'essor de l'élevage. Elle constitue la première classe de médicaments utilisés en médecine vétérinaire avec une part de marché de 30% environ. **(PUYT. J-D, 2004) ; (ANONYME 3 a, 2006)**

Leur importance tient également au risque présenté par les antibiorésistances

Bactériennes. Les bactéries d'une manière générale, après un contact prolongé avec la plupart des antibiotiques deviennent moins sensibles, voire insensibles à ces antibiotiques. Ce problème devient très préoccupant pour plusieurs raisons :

- Tous les antibiotiques, quels qu'ils soient, ont tendance, au fil des années, à perdre une partie, voire la totalité de leur efficacité vis-à-vis de certaines bactéries ; ils subissent ainsi surtout si leurs emplois sont mal conduits, une véritable usure avec le temps.
- Ces résistances peuvent se transmettre de l'animal à l'homme ; des cas mortels d'infection chez l'homme sont dus à des bactéries devenues résistantes à tous les antibiotiques.

Leur utilisation en médecine vétérinaire peut avoir des répercussions considérables d'un point de vue de l'hygiène publique. C'est pourquoi, compte tenu de leur très large utilisation, la prescription d'antibiotiques doit être aussi limitée que possible et la quasi-totalité d'entre eux est :

- Inscrit à la liste I des substances vénéneuses,
- Visés à l'article L-617-6 alinéa e) en tant que substances susceptibles de laisser des résidus dangereux lorsqu'ils sont utilisés en thérapeutiques chez les animaux de rente.
- Soumis à la fixation de Limites Maximales Résiduelles (LMR) pour apporter au consommateur toutes garanties d'innocuité. **(ANONYME2, 2006) ; (PUYT. J-D, 2004) ; (GAUTHIER. E, 1993)**

### 3. HISTORIQUE

En 1928, Sir. Alexander Fleming, va faire la découverte qui allait changer le monde de la thérapeutique lorsqu'il constata que les boîtes de Pétri, où il faisait pousser des staphylocoques, ont été envahies par des colonies cotonneuses d'un blanc verdâtre ; « *Penicillium notatum* » **(ABLAINE. ML, 2004) ; (GAUTHIER.E, 1993)**

Alors qu'il doit désinfecter ces boîtes contaminées, Fleming s'aperçoit qu'autour des colonies de moisissure, il existe une zone circulaire dans laquelle le staphylocoque n'a pas poussé. Il émet l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon en est responsable et lui donne le nom de pénicilline. **(DUVAL. J et SOUSSY. C-J ,1990) ; (MILHAUD et al, 1982)**

En 1939, Howard Walter Florey et Ernest Boris Chain, réussirent à isoler l'agent actif de la pénicilline **(DOUCET, 1998) ; (PERREAULT et POULIN, 1997)**, ils ont fait des essais thérapeutiques sur l'animal, puis sur l'homme. **(MILHAUD et al, 1982)**

Entre 1942-1945, développement des procédés industriels de préparation des pénicillines **(DUVAL. J et SOUSSY. C-J ,1990) ; (MILHAUD et al, 1982)**

En 1943, Schatz et Waksman isolaient une souche de *Streptomyces griseus* et mettaient en évidence son activité antimicrobienne en 1944 **(BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1999)**.

En 1945, G. Brotzu isolait une souche de *Céphalosporium acremonium* à partir d'un réseau d'égouts **(BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1999)**.

En 1949, Kane, Finlay et Sabin, isolait l'oxytétracycline à partir de *Streptomyces rimosus* **(BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1999)**.

En 1949, Behrens mettait en évidence la notion de précurseur et de préparation de pénicillines biosynthétiques **(MILHAUD et al, 1982)**.

En 1950, préparation des pénicillines « retard » **(MILHAUD et al, 1982)**.

En 1952, Mac Guire isolait l'érythromycine à partir de *Streptomyce erythraeus* **(BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1999)**.

1959 : Batchelor, isolait l'acide amino-6 pénicillinique et préparait des pénicillines semi-synthétiques. **(MILHAUD et al, 1982)**

En octobre 1964, Dorothy Crowfoot Hodgkin recevait un prix Nobel en chimie pour avoir découvert la structure moléculaire de la pénicilline. **(DUVAL. J et SOUSSY. C-J ,1990)**

#### **4. MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES**

À la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne ; cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés :

- Sur la paroi bactérienne : en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère

à la bactérie sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne (**LAGIER. G, 1998**)

- Sur la membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.
- Sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.
- Sur l'ADN : en empêchant sa réplication et de la biosynthèse protéique.
- Autres : en agissant en tant qu'anti métabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries). (**CUQ, 2008**) ; (**PUYT, 2006**) ; (**PUYT J.D 2002**) ; (**YALA, MERAD ET AL, 2001**) ; (**COHEN et JAQUOT, 2001**)

## **5. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES**

### **5.1 CRITÈRES DE CLASSIFICATION**

Selon **Duval et Soussy (1990)** ; **Philippon (2006)** les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- leur origine (bio synthétisé par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, issus du génie chimique) ;
- leur composition chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques) ;
- leur activité (antibactériens, antifongiques, antimitotiques). Nous nous intéresserons ici uniquement aux antibiotiques à activité antibactérienne ;
- mode d'action ;
- modalité d'action.

De toutes ces classifications possibles, la classification la plus courante est celle par famille, possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique ou origine, spectre d'action similaire ou très rapprochée, cibles bactériennes identiques, résistance bactérienne et sensibilisation croisée, effets indésirables rapprochés. **(YALA, MERAD *et al*, 2001)** ; **(DUVAL et SOUSSY, 1990)** ; **(MAUR, 1990)**

### **5.1.1. Classification des antibiotiques selon leur origine**

Les anti-infectieux peuvent être produits de trois façons, par fermentation (naturelle), par semi-synthèse ou par synthèse chimique.

#### **5.1.1.1. Fermentation ou extraction**

Les antibiotiques sont fondamentalement des substances naturelles issues du métabolisme azoté de divers micro-organismes : **(PUYT, 2006)** ; **(MAUR, 1990)**

- Soit des champignons inférieurs (mycètes) : du genre *Penicillium* pour les Pénicillines, Griséofulvine et genre *Céphalosporium* pour les Céphalosporines
- soit des bactéries : du genre *Streptomyces* (90 % des antibiotiques sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*) et genre *Bacillus*. Comme antibiotiques dont l'origine est bactérienne on trouve, la Bacitracine, Polymyxine-Colistine, Mupirocine, Céphamycines, Monbactames (les Monbactames obtenues initialement par extraction, sont obtenues actuellement par synthèse)

La fermentation est le procédé le plus habituel pour les composés naturels, c'est aussi le premier stade de la préparation des antibiotiques de semi-synthèse. Elle s'opère en deux étapes :

- une étape purement microbiologique de production de l'antibiotique, qui elle-même se décompose en trois phases importantes, une première phase de sélection des souches productrices qui peut être pratiquée naturellement par repiquages successifs sur des milieux adaptés qui vont favoriser le développement de la souche désirée ou être provoquée artificiellement par des traitements physiques (UV, ultra-sons, rayons x) ou chimiques, une seconde phase de pré fermentation, au

cours de laquelle la souche sélectionnée est placée dans des conditions optimales de multiplication cellulaire et qui a lieu dans des fermenteurs de faible capacité (20 à 60 L), et dans une troisième phase de fermentation, la culture produite est transférée dans de grands fermenteurs (50 000 à 500 000 L) remplis d'un milieu nutritif adapté (glucides, protéines, lipides, minéraux) et stérile pour éviter le développement concurrentiel de micro-organismes indésirables. Des conditions optimales de température, de pH et d'oxygénation du milieu nutritif sont en permanence assurées. La production de l'antibiotique dure alors habituellement entre 7 à 10 jours. Parfois on ajoute des précurseurs chimiques particuliers qui sont des substrats directement incorporables dans la biosynthèse de certains antibiotiques ; on oriente ainsi la production vers des antibiotiques produits normalement en très faible quantité ; ce sont les antibiotiques biosynthétiques. **(PUYT, 2006) ; (PUYT, 2004)**

- et une étape d'extraction et de purification, qui fait appel à des techniques physiques ou chimiques courantes et reposent sur les caractéristiques physico-chimiques de l'antibiotique : Filtration ou centrifugation, puis extractions par dissolution ou précipitation différentielle à l'aide de solvants appropriés. Enfin après cette étape, les antibiotiques ne sont pratiquement jamais employés tels quels sous forme de base ; ils sont le plus souvent salifiés ou estérifiés et se présentent sous forme de sels (chlorhydrate, sulfate, sel de sodium) ou d'esters (acétate, embonate, estolate, lactobionat). **(PUYT, 2006) ; (PUYT J.D, 2002)**

#### 5.1.1.2. SEMI-SYNTHESE

Les antibiotiques ainsi produits par voie fermentai sont parfois utilisés pour la préparation de dérivés artificiels voisins, mais qu'il est impossible de faire sécréter par la souche microbienne, même en recourant à des précurseurs.

Dans ce but, on fait subir certains traitements chimiques simples à des antibiotiques produits par voie fermentai, notamment des hydrolyses pour séparer la partie fondamentale de la molécule, trop complexe pour être préparée par synthèse à un coût raisonnable ; on greffe ensuite sur ce

squelette de base différents groupements particuliers grâce à des estérifications ou des amidifications.

On obtient ainsi des antibiotiques de semi-synthèse c'est le cas des pénicillines ou des céphalosporines dont la plupart des représentants sont ainsi produits.

Certains sont des pro drogues antibiotiques, totalement dénuées par elles-mêmes d'activité biologique, mais qui acquièrent leur pouvoir antimicrobien après hydrolyse de la fonction ester qui été greffée. **(PUYT. J-D, 2006) ; (JOLLIET. P et al, 1998)**

#### 5.1.1.3. SYNTHÈSE CHIMIQUE TOTALE

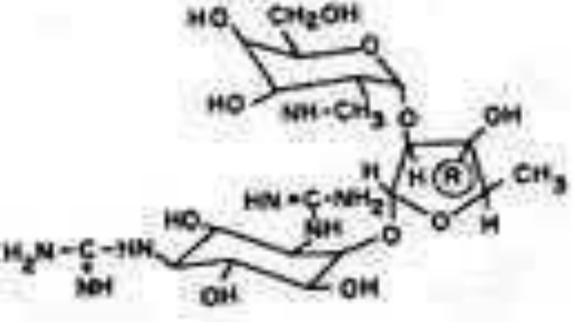
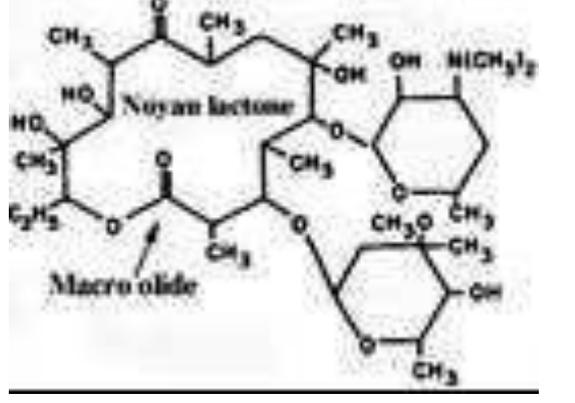
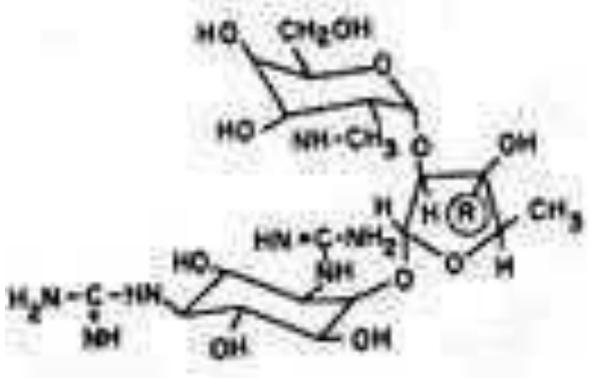
Certains antibiotiques dont la structure est assez simple sont produits plus économiquement par synthèse que par fermentation. C'est le cas du Florphénicol, Chloramphénicol, Monobactames, et tous les agents antibactériens de synthèse : Sulfamides, Triméthoprim, Quinolones, Nitrofuranes, etc. Le fait que certains antibiotiques (Chloramphénicol, Aztréonam) obtenus au début par fermentation sont actuellement produits par synthèse chimique fait de plus en plus disparaître la distinction initiale entre antibiotiques et agents antibactériens de synthèse. **(GOGNY. M, PUYT. J-D, 2001)**

Les anti biomimétiques ou antibactériens de synthèse, sont des composés entièrement artificiels qui n'existent pas dans la nature, sont obligatoirement produits par synthèse chimique. **(PUYT, 2006) ; (MAUR, 1990)**

#### **5.1.2. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LA STRUCTURE CHIMIQUE**

Très variable, souvent une structure de base comme le cycle  $\beta$ -lactame (famille des Bêta-lactamines) sur laquelle il y a hémi synthèse. Elle donne souvent, le nom à la famille **(GOGNY. M et al, 2001)**. Le tableau -I- montre la structure générale de quatre familles d'antibiotiques.

Tableau n° I : structure générale de quelques familles d'antibiotiques (Philippon, 2006).

Aminosides	Macrolides
	
Phénicolés	Tétracyclines
	

### 5.1.3. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LA CIBLE BACTERIENNE

Selon la cible bactérienne au niveau de laquelle ils agissent, les antibiotiques peuvent être classés en quatre groupes :

#### 5.1.3.1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne

Contrairement aux cellules animales, les bactéries possèdent une enveloppe extérieure rigide : la paroi. C'est elle qui lui donne sa forme, et la protège des perturbations osmotiques que pourrait lui imposer le milieu environnant.

Cette structure est tout à fait originale. Ainsi tout antibiotique agissant spécifiquement sur cette paroi, aura une grande sélectivité d'action et sera dépourvu d'effets sur les cellules animales.

(HELLALI A. K, 1999)

La paroi est constituée essentiellement de peptidoglycane, ou mucopeptide, qui est une macromolécule polysaccharidique constituée par une succession régulière d'acétoglucosamine et d'acide N-acétylmuranique.

Ces acides aminés sont attachés en petits peptides et ceux-ci sont reliés entre eux par des ponts peptidiques conférant une grande rigidité à l'ensemble. Cette transpeptidation est la dernière étape de la synthèse de la paroi bactérienne et elle se fait sous l'influence d'une enzyme, la transpeptidase. **(BOURIN *et al*, 1993)**

Privées de leur paroi, les bactéries deviennent molles, fragiles et sans défense vis-à-vis des agressions mécaniques et des perturbations osmotiques ; on les appelle alors des protoplastes ou sphéroplast, et leur vie est brève. **(BOURIN *et al*, 1993)**

Les antibiotiques agissant de cette façon sont soit des inhibiteurs sélectifs de synthèse de la paroi bactérienne grâce à leur ressemblance structurale avec les acides aminés sur lesquels agit la transpeptidase. Ils se fixent sur cet enzyme et inhibent son action, empêchant ainsi la formation des ponts polyglycines du mucopeptide pariétal rigides, soit des inhibiteurs du transfert et de la polymérisation du mucopeptide pariétal, soit enfin des inhibiteurs de la première phase de l'utilisation de l'alanine au niveau de la paroi. Parmi ces antibiotiques on trouve les Béta-lactamines, Vancomycine, Fosfomycine, et la Cyclosporine. **(PHILIPPON, 2006) ; (BOURIN *et al*, 1993) ; (MAUR, 1990)**

#### 5.1.3.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cellulaire cytoplasmique bactérienne

Ces antibiotiques agissent même sur les bactéries en phase de repos. Ils exercent une action directe et immédiate sur la membrane cytoplasmique (qui limite le cytoplasme bactérien comme une barrière osmotique semi-perméable). Cette action est comparable à celle des antiseptiques surfactifs. Parmi ces antibiotiques, on trouve la tyrothricine, les polypeptides cycliques, polymyxines, colistine. **(PHILIPPON, 2006) ; (BOURIN *et al*, 1993) ; (MAUR, 1990)**

#### 5.1.3.3. Antibiotiques agissant au niveau des ribosomes

Ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines bactériennes par action sur les ribosomes :  
**(PHILIPPON, 2006) ; (MAUR, 1990)**

- Inhibition au niveau des sous-unités 30 S des ribosomes : Aminoglycosides (lecture de l'ARN<sub>m</sub> est perturbée).
- inhibition au niveau des sous-unités 50 S des ribosomes : soit par inhibition du site A (aminoacyl) avec translocation perturbée pour les macrolides, soit par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN pour les tétracyclines, soit par inhibition du facteur d'élongation EF-G pour l'acide fusidique, soit enfin par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN et l'inhibition de la peptidyltransférase pour les Phénicolés

#### 5.1.3.4. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques

Selon **Philippon (2006)** ces antibiotiques inhibent soit :

- la réplication de l'ADN : inhibition de l'ADN-gyrase ou topoisomérase II (sous unité A), c'est le cas des quinolones.
- la transcription de l'ARN : inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante (sous unité B), c'est le cas rifamycines

#### 5.1.3.5. Antibiotiques agissant par d'autres mécanismes

Ces antibiotiques agissent en tant qu'anti métabolites bactériens en inhibant une des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries. C'est le cas des sulfamides, triméthoprime (qui inhibent la dihydroptéroate synthétase : DHPS), et l'isoniazide (analogues structuraux du NAD).

**(PHILIPPON, 2006)**

## **5.2. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LE SPECTRE D'ACTIVITÉ**

Chaque antibiotique est caractérisé par un spectre qui correspond à l'éventail des germes qu'il peut toucher, à dose plus ou moins élevée. Il est différent pour chaque famille d'antibiotiques, bien qu'il puisse se recouper, en partie ou en totalité, avec celui d'autres antibiotiques, c'est-à-dire que les mêmes germes peuvent être sensibles à plusieurs antibiotiques à la fois. On a ainsi des antibiotiques à spectre très large, large, moyen, ou étroit. **(MAUR, 1979)**

Ce spectre va guider le vétérinaire dans son choix. Même si les sensibilités mesurées en laboratoire ne sont pas forcément celles obtenues en élevage. Les bactéries, en effet, peuvent acquérir des résistances et un certain nombre d'entre elles ne manquent pas d'imagination pour se protéger des antibiotiques. Le staphylocoque qui devient inaccessible en se calfeutrante dans des micro abcès mammaires ou la salmonelle qui se réfugie à l'intérieur des cellules en sont autant d'exemples. **(EUZEBY, 2007) ; (YAHY, 1997)**

## **5.3. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES PAR FAMILLE**

Les antibiotiques sont divisés en familles ; le classement n'est pas tout à fait cohérent, puisque le point commun des divers antibiotiques d'une classe peut être tantôt chimique (les Beta-lactamines, les sulfamides, les polypeptidiques, les aminosides, les macrolides, les fluoroquinolones), tantôt une bactérie sur laquelle ils sont efficaces (les antituberculeux, les antistaphylococciques). Il peut s'y rajouter une notion de moment d'apparition : ex : céphalosporines de 1<sup>re</sup>, de 2<sup>e</sup>...génération.

Les familles chimiques contiennent plusieurs molécules, dont les spectres d'action sont semblables, mais non identiques et les effets indésirables assez voisins. D'où l'intérêt de savoir toujours situer un antibiotique dans sa classe (ce qui est facile avec un Vidal), même si les différentes molécules d'une classe peuvent parfois être très différentes en termes de devenir dans l'organisme. **(LECHAT, 2007)**

## **6. PHARAMACOCINETIQUE DES ANTIBIOTIQUES**

Pour éradiquer une infection, l'antibiotique doit parvenir à son site d'action, c'est-à-dire atteindre les germes situés dans une structure donnée d'un organe, dans une cellule ou dans des liquides extra / péri-cellulaires, à des concentrations adéquates, et cela pendant le temps nécessaire. Ce passage du lieu d'administration jusqu'au site(s) d'action se fait en quatre phases différentes. **(SAUX, 2006)**

### **6.1. ABSORPTION**

L'absorption d'une molécule c'est-à-dire son passage du site d'administration à la circulation sanguine est fonction à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration notamment de la voie (orale, parentérale) et de la formulation du médicament **(GUILLEMOT, 2006)**.

Elle doit permettre le passage du médicament du site d'administration vers la circulation générale, pour que l'antibiotique puisse ensuite parvenir au site de l'infection. Certaines classes d'antibiotiques ont une bonne absorption digestive (macrolides, tétracyclines, sulfamides). Pour d'autres classes, l'absorption est nulle (aminosides, polypeptides), et la voie injectable est nécessaire pour obtenir un effet systémique. Enfin, dans certaines classes d'antibiotiques (Béta-lactamines), certaines molécules sont bien absorbées, ce qui permet l'administration orale alors que d'autres devront être injectées. **(SAUX, 2006) ; (KECK .G -a-, 1978)**

Pour les antibiotiques administrés par voie orale, il peut exister des interactions gênantes ainsi, l'absorption des tétracyclines est très diminuée par l'ingestion concomitante de sels d'aluminium, de fer ou de calcium. L'absorption peut aussi être modifiée (en plus ou en moins) lorsqu'il existe chez un malade une pathologie du tube digestif. **(LECHAT, 2006) ; (SAUX, 2006)**

### **6.2. DISTRIBUTION**

L'antibiotique parvient au site de l'infection plus ou moins bien : certains organes sont mieux irrigués que d'autres ; le site même de l'infection peut être mal irrigué (amas fibrino-leucocytaire de végétations valvulaires cardiaques, abcès entouré d'une coque). Les germes peuvent être

situés dans le sang ou dans les espaces extracellulaires, ou à l'intérieur de cellules qui les ont phagocytés. Lorsque le passage de l'antibiotique du sang vers un site d'infection se fait par diffusion passive, il se fera d'autant mieux que le gradient des concentrations (de la forme libre, seule diffusible) entre le plasma et les tissus sera important. Dans ce but, on peut même chercher un mode d'administration qui procure des concentrations les plus élevées possible (des pics), avec pour limite la toxicité propre éventuelle de l'antibiotique. La pénétration dans le système nerveux, l'œil et la prostate sont dépendants d'un transport actif. Si les bactéries se développent à l'intérieur de cellules, il faudra que les antibiotiques puissent y parvenir, sous une forme active ; un pH intra cellulaire plus ou moins acide ou basique modifie la vitesse de traversée des membranes par des molécules, plus ou moins ionisées.

Les quinolones, la rifampicine, l'isoniazide, l'association sulfaméthoxazole– triméthoprimé pénètrent particulièrement bien.

L'administration d'une molécule à une dose et à un rythme donné peut donc être efficace sur une infection causée par un germe donné si elle est située dans un organe, et pas efficace si elle est située dans un autre. Le tube digestif, les méninges, la prostate, l'os ou les cavités urinaires par exemple posent des problèmes d'accès très différents. **(LECHAT, 2006) ; (KECK .G –b-, 1978)**

### **6.3. TRANSFORMATIONS**

Comme tous les médicaments, les antibiotiques peuvent subir des transformations, en métabolites, actifs ou non sur les bactéries, toxiques ou non (c'est à dire induisant des effets indésirables). Les substances actives peuvent être métabolisées par différents organes. Si toutes les cellules de l'organisme possèdent une capacité métabolique de base, certains organes ont une capacité métabolique importante (foie, rein, poumon). La transformation d'une molécule par le métabolisme dépend de la structure de la molécule et des voies métaboliques exprimées chez l'animal. Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs sur le plan de l'activité antimicrobienne tandis que d'autres sont peu métabolisées ou que le métabolisme conduit à des métabolites actifs au plan microbiologique. **(GUILLEMOT, 2006) ; (KECK .G -c-, 1978)**

## 6.4. EXCRÉTION

Les concentrations dans un certain nombre de sécrétions ou excréta de l'organisme (bile, urine, lait, salive, mucus pulmonaire, sécrétion intestinale, sueur) varient au cours du temps en fonction des modalités d'excrétion passive ou active de la molécule et de ses métabolites. L'étude de la cinétique plasmatique d'une molécule après administration intraveineuse et la mesure des quantités émises sous forme de substance parentale et de métabolites, estimées sur la base des concentrations moyennes mesurées sur des quantités d'excréta collectés au cours du temps, permet de mesurer la clairance totale et la part relative de la clairance métabolique et de la contribution des principaux organes d'élimination. La capacité d'élimination d'un principe actif est exprimée par la clairance totale (ou clairance plasmatique) qui est la somme des différentes clairances (clairance métabolique du foie, clairance d'excrétion biliaire, clairance d'excrétion rénale). Ces clairances peuvent présenter de grandes variabilités interspécifiques.

Compte tenu de la complexité des étapes impliquées dans la pharmacocinétique d'un antibiotique, les concentrations mesurées à un instant chez différents animaux traités à la même dose, avec le même médicament, par la même voie d'administration, ont une variabilité importante qui s'accroît avec le temps. **(GUILLEMOT, 2006) ; (KECK .G d, 1978)**

## 7. PRINCIPAUX EFFETS INDÉSIRABLES DES ANTIBIOTIQUES

Selon **EDDER ET ORTELLI (2006)**, les principaux effets indésirables des antibiotiques sont résumés dans les points suivants :

- Bêta-lactamines : Allergie, fièvre, convulsions (péni G, imipénème).
- Lincosamides (clindomycine : dalacine): Colite pseudo-membraneuse, *Clostridium difficile*
- Macrolides : troubles digestifs, surtout avec certains médicaments (théophylline, ergot de seigle)
- Sulfamides : toxidermie, syndrome de Lyell, neutropénie.
- Aminosides : ototoxicité, néphrotoxicité
- Glycopeptides : néphrotoxicité, ototoxicité, allergie
- Cyclines : photosensibilisation, dépôts osseux, dents, troubles digestifs.

- Fluoroquinolones : photosensibilisation, myalgie, arthralgie, tendinopathie.
- Phénicolés : hématotoxique.
- Rifampicine : inducteur enzymatique (interactions médicamenteuses), allergie

## **8. USAGES DES ANTIBIOTIQUES EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE**

Les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs variables.

**(SCHWARZ *et al*, 2001)**

- Les antibiotiques sont tout d'abord utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Le traitement a aussi pour effet de réduire la souffrance et de restaurer la production (lait, viande). Il réduit l'excrétion bactérienne, permettant dans certains cas d'obtenir une guérison bactériologique et lors d'infection zoonotique, il peut éviter la contamination humaine. **(JACQUEMIN, 2006) ; (MCKELLAR, 2001)**
- 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. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes. **(JACQUEMIN, 2006) ; (MAILLARD, 2002)**

Les antibiotiques peuvent, parfois, être administrés à des périodes critiques de leur vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue, après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire. Dans ces conditions, on parle d'antibioprévention, 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. L'antibioprophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes.

- L'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance a fait l'objet de nombreuses critiques. Il est très limité actuellement et été totalement abandonné fin 2005 en Europe. Ces antibiotiques régulateurs de flores (ARF) ou antibiotiques promoteurs de croissance (AGP pour antibiotic growth promotors) sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et sont tous des agents chimiothérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur. **(JACQUEMIN, 2006) ; (BEZOEN *et al*, 1999)**

## DEUXIÈME CHAPITRE : PRODUCTION ET QUALITÉ DU MIEL

### 1. INTRODUCTION

Le miel, substance sucrée totalement naturelle est l'un des produits issus de la ruche employée depuis des millénaires par de nombreuses civilisations, pour ses qualités nutritionnelles et ses utilisations thérapeutiques. Au cours de l'Antiquité, le miel a eu une valeur religieuse importante. Des usages médicaux sont également évoqués dans diverses pharmacopées, notamment pour le soin des plaies infectées ou pour donner du tonus.

### 2. DEFINITION

Dans de nombreux pays, la loi fournit une définition légale du miel. Cette dernière a pour objet la protection du consommateur contre les différents types de fraudes susceptibles d'être pratiqués (LOUVEAUX, 1968).

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles mellifiques à partir du nectar des fleurs ou des sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou d'excrétions d'insectes piqueurs-suceurs des parties vivantes de plantes, que les abeilles butinent, transforment et combinent avec des matières spécifiques qu'elles sécrètent, et qu'elles emmagasinent, concentrent et laissent mûrir dans des rayons de la ruche. (BOGDANOV. S ET al, 1999) ; (BOGDANOV. S et al ,1997)

Le miel est un produit entièrement naturel qui ne peut contenir ni additif, ni colorant, ni conservateur, ni parfum artificiel. Il arrive sur votre table telle que les abeilles l'ont fait et telle que l'apiculteur consciencieux l'ait récolté. C'est pourquoi le simple mot "miel" sur un emballage est dorénavant suffisant pour vous assurer de son origine 100% pure et naturelle et que vous ne trouvez plus sur les pots et documents publicitaires que ce seul terme, suivi de sa provenance botanique ou régionale, sans aucun adjectif associé comme c'était le cas il y a encore quelques années où l'on voyait "fleurir" des appellations telles que : "Miel pur surfin" - " Miel naturel" - "Miel sain extra fin". (BOGDANOV. S, 2004)

Le *Codex alimentarius* définit le miel comme suit :

« Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes ou de sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment, en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. À l'exception du miel filtré, aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré». (**CODEX ALIMENTARIUS, 2009**)

### **3. DESCRIPTION**

Le miel consiste essentiellement en différents sucres, mais surtout en glucose et en fructose ainsi qu'en d'autres substances telles que des acides organiques, des enzymes et des substances solides provenant de la récolte du miel. La couleur du miel peut aller d'une teinte presque incolore au brun foncé. Le miel peut avoir une consistance fluide, épaisse ou cristallisée (en partie ou en totalité). Sa saveur et son arôme varient, mais dérivent en général de la plante dont le miel provient. (**BOGDANOV. S et al, 1999**)

### **4. PRODUCTION DU MIEL**

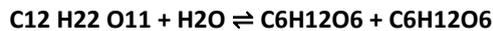
Comme nous le savons, la fabrication du miel résulte du travail des abeilles appartenant aux *Hyménoptères*, toutes les abeilles ont besoin pour se nourrir du nectar et du pollen qu'elles pompent sur les fleurs, assurant par la même occasion la pollinisation des plantes.

Au sein de la ruche, chaque abeille a un rôle bien défini qui évolue au cours de sa vie. Les butineuses sont responsables de la récolte du nectar ou du miellat. Le nectar est un liquide sucré, sécrété par les glandes nectarifères, souvent présentes au fond de la corolle des fleurs alors que le miellat est une sécrétion issue de la plante (comme pour le sapin par exemple).

Les abeilles effectuent **20 à 50** voyages par jour, depuis la ruche jusqu'à la plante dans un rayon de **500m à 2 km** depuis la ruche.

Le miel est produit selon le processus suivant : le nectar est prélevé par les abeilles butineuses, qu'elles emmagasinent dans leur jabot avec la salive, elles transforment le saccharose en sucre simple (fructose, glucose) selon la réaction chimique suivante sous l'action de Gluco-invertase **(GONNET, 1982)** :

Invertase



Arrivées à la ruche, les butineuses transmettent le nectar aux ouvrières, qui le régurgitent encore à d'autres abeilles. La teneur en eau du liquide sucré s'abaisse et s'enrichit en même temps de sucs gastriques et de substances salivaires. Il est ensuite déposé dans une alvéole qui sera operculée par une couche de cire afin d'assurer sa conservation. La concentration en eau est encore de **50%** et va diminuer progressivement par évaporation grâce à la chaleur régnant dans la ruche et à la ventilation assurée par les abeilles ventileuses.

On obtient ainsi une substance concentrée en sucres simples **(80%)** et pauvre en eau **(18%)** qui constitue pour la ruche une réserve alimentaire énergétique ne s'altérant pas dans le temps. Les abeilles bâtisseuses vont également s'en servir pour former la cire nécessaire à la construction des cellules de la ruche.

La récolte se pratique généralement à partir de mi-avril jusqu'à novembre selon les régions, en récupérant les cadres garnis de miel. Les alvéoles sont ensuite désoperculées manuellement avec un couteau ou plus souvent mécaniquement et le miel est extrait des cellules par force centrifuge. Il doit ensuite être épuré par filtration, centrifugation ou décantation sans toutefois éliminer totalement les grains de pollen. **(DONADIEU, 1984) ; (GONNET, 1982)**

## 5. TYPES DE MIEL

Le miel varie selon l'origine florale, la détermination de l'origine géographique du miel repose sur l'analyse pollinique du miel .nous avons les miels :

### **5.1. MIELS MONO FLORAUX**

Issu d'un nectar, ou d'un miellat, collecté par les abeilles sur un végétal unique et particulièrement attractif pour ces insectes. Les miels mono floraux possèdent des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques spécifiques. **(BOGDANOV. S, 2003)**

### **5.2. MIELS POLY FLORAUX**

Ou miel toutes fleurs, sont souvent classés suivant les lieux de récolte (miel de montagne, de forêt), ou encore suivant les saisons (miel de printemps ou d'été). **(DONADIEU. Y, 1984)**

## **6. PROPRIÉTÉS**

Le miel se présente sous l'aspect d'une substance :

*visqueuse* : la consistance du miel, qui peut atteindre l'état solide, est très variable ; elle est conditionnée essentiellement par sa teneur en eau, sa composition chimique et la température à laquelle il est conservé ; par ailleurs, les sucres contenus dans le miel peuvent cristalliser en partie sous l'influence de certains facteurs (température, agitation, composition chimique), entraînant alors une modification complète de son aspect, mais sans rien changer à sa composition de couleur variable : la couleur du miel va du jaune très pâle (presque blanc) au brun très foncé (presque noir) en passant par toute la gamme des jaunes, oranges, marrons et même parfois des verts; mais le plus souvent, le miel est blond de saveur très sucrée, plus ou moins aromatique et d'odeur différente selon son origine botanique.

Par ailleurs le miel : est soluble dans l'eau et l'alcool dilué, mais insoluble dans l'alcool fort, l'éther, le chloroforme et le benzène a une densité moyenne de 1,42 à la température de 20 C°, n'est pas un bon conducteur thermique (environ 6 fois moins que l'eau) a une conductibilité électrique fortement variable suivant sa teneur en eau et en matières minérales a un indice de réfraction qui oscille entre 1,47 et 1,50 (suivant sa teneur en eau) à la température de 20°C est lévogyre (qui dévie le plan de polarisation de la lumière à gauche) dans la plupart des cas.

Enfin, le miel est acide : son pH oscillant, en moyenne, entre 3,5 et 6 (nous vous rappelons qu'en matière de pH le chiffre 7 représente la neutralité).

### 6.3. PROPRIÉTÉS DIÉTÉTIQUES

Le miel est avant tout un aliment naturel riche en sucres simples directement assimilables (se passant donc de digestion préalable), doués d'un pouvoir sucrant plus important que le sucre blanc (ou roux) ordinaire composé uniquement de saccharose, tout en ayant un apport calorique moindre, contrairement à ce que beaucoup de gens pensent.

En effet, le pouvoir sucrant des fructose et glucose contenus dans le miel est en moyenne de 1,3 par rapport à une base de 1 pour le saccharose du sucre de canne ou de betterave, et 100 g de miel apportent en moyenne 300 calories, alors que 100 g de sucre en apportent 400 !

C'est dire que pour sucrer également quelque chose, où il vous faut 10 g de sucre, il ne vous faut que 7,5 g de miel, et qu'au lieu d'absorber 40 calories, vous n'en prenez que 22, soit presque la moitié.

Cette richesse en fructose et glucose du miel est à l'origine de son importante action dynamogénique et stimulante du cœur recherchée par les sportifs et les gens fatigués, ainsi que de sa puissance calorique qui lui permet de satisfaire aux besoins énergétiques de l'organisme dans des conditions optimales sous un volume très réduit de nourriture, ce qui est d'un grand intérêt dans tous les cas de perte de l'appétit (surtout chez les enfants et les personnes âgées) et dans certains régimes alimentaires médicaux (celui de l'insuffisance rénale par exemple).

De par sa richesse en éléments biologiques, le miel augmente aussi les capacités du système de défense immunitaire, renforçant ainsi la résistance de notre terrain dans sa lutte contre les agressions en général. Richesse qui participe aussi directement à une action non négligeable de complémentation alimentaire palliant de nombreuses micro carences qui sont source, à la longue, de troubles maladiés plus ou moins importants.

Par ailleurs, le miel favorise l'assimilation du calcium et la rétention du magnésium par l'organisme, deux minéraux essentiels au bon fonctionnement de notre "usine" biologique, ce qui explique que les enfants qui bénéficient de miel dans leur alimentation quotidienne se développent beaucoup mieux que ceux qui ont seulement du sucre blanc, avec notamment une meilleure et plus rapide calcification osseuse et dentaire.

Grâce à ses nombreux enzymes, il facilite également l'assimilation des autres aliments en général, d'où une meilleure digestion et un meilleur transit intestinal.

Enfin, le miel, tout en ayant un pouvoir sucrant supérieur à celui du saccharose, possède une action nettement moins nocive que celui-ci dans la genèse des caries dentaires. Argument supplémentaire, s'il en était encore besoin, pour lui donner la préférence dans le régime alimentaire, notamment des enfants et des adolescents.

#### 6.4. PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES

Elles sont nombreuses, nous les avons regroupées par ordre alphabétique ci-après. Précisons que si chacune de ces actions existe bien pour tous les miels, elles peuvent toutefois varier en importance selon la variété de miel considéré.

Tableau n°1 : Propriétés thérapeutiques communes à tous les miels. (Alix Iefief-delcourt 2010) ; (Anonyme1, 2012)

PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES COMMUNES À TOUS LES MIELS	
ANTI-ANÉMIQUE	Qui combat l'anémie.
ANTISEPTIQUE	Qui détruit les microbes.
APÉRITIVE	Qui stimule l'appétit.
BÉCHIQUE	Qui calme la toux.
DIGESTIVE	Qui aide à la digestion.
DIURÉTIQUE	Qui augmente la sécrétion de l'urine.
DYNAMOGÉNIQUE	Qui augmente la force et l'énergie.

ÉMOLLIENTE	Qui relâche, détend et amollit les tissus enflammés.
FÉBRIFUGE	Qui combat la fièvre.
LAXATIVE	Qui facilite le transit intestinal.
SÉDATIVE	Qui calme.
VICARIANTE	Qui supplée à la déficience.

Le miel n'a pas un goût, mais des goûts. Impossible donc d'affirmer « Je n'aime pas le miel » en testant un seul. Ils sont tellement différents, tant en saveur qu'en intensité, qu'il ne faut surtout pas résister à l'envie de tous les découvrir.

Certains ont un arôme doux et délicat, d'autres un parfum puissant et intense. Dans la première famille, on trouvera par exemple les miels d'ACACIA ou de TOURNESOL ; dans la seconde, ceux de TILLEUL ou de THYME. Certains rappellent la flaveur de la plante ou de la fleur dont ils sont issus, d'autres non. (ALIX LEFIEF-DEL COURT, 2010) ; (ANONYME1b, 2012)

## 7. CONTRÔLE DU MIEL

Les critères de qualité du miel figurent dans une directive européenne (**directive, 1974**) et dans la norme du **Codex Alimentarius (1993)** qui sont toutes deux actuellement en révision (**proposition, 1996, Codex draft, 1998**). Les méthodes d'analyses usuelles utilisées pour le contrôle de routine du miel et a effectué des essais inter laboratoires en collaboration avec la commission du miel du Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA). Les méthodes ont tout d'abord été publiées dans le MSDA (MSDA, 1995) puis dans une version légèrement modifiée dans "Apidologie". (CORNELIS. M et JOURET. M, 2001) ; (BOGDANOV *et al*, 1997)

On utilise des méthodes d'analyse à la fois nouvelles et plus performantes, il est nécessaire de revoir les normes qui s'appuient sur ces nouvelles méthodes. Les nouveaux critères de qualité tels que teneur en sucres spécifiques et conductivité électrique ainsi que les nouvelles méthodes d'analyses harmonisées de la qualité du miel ont fait l'objet de discussions. Les projets de normes du *Codex Alimentarius* et de l'Union européenne (UE). En général, c'est la norme du Codex Alimentarius qui est valable pour le commerce mondial de miel, mais d'autres normes telles que la norme européenne pour le miel peuvent également être appliquées lorsque les exigences régionales en matière de qualité ne correspondent pas au Codex Alimentarius. **(CORNELIS. M ET JOURET. M, 2001) ; (BOGDANOV, 1999)**

Le projet proposé par l'UE est très semblable à celui du Codex, mais contient moins de détails spécifiques. Les prescriptions relatives à la désignation du miel et les normes pour le miel sont pratiquement identiques, mais on peut distinguer quelques différences entre les deux projets et qui sont :

1. Contrairement au projet de l'UE, celui du Codex contient des paragraphes spéciaux relatifs à la contamination, à l'hygiène et à la falsification des sucres. En Allemagne et en France, on a découvert des falsifications de miel chinois.
2. D'après le *Codex Alimentarius*, les normes de qualité ne doivent pas obligatoirement être suivies à l'exception de la teneur en eau ; libre aux gouvernements de les appliquer ou non. Cependant, selon le projet de l'UE, les normes de qualité doivent être remplies pour tous les miels qui sont vendus au détail.
3. La norme de l'UE contient la définition de "miel industriel" ou "miel de pâtisserie" qui n'est pas contenue dans le projet du Codex : "Miel destiné à la consommation humaine, mais qui présente un goût ou une odeur étrangère, qui est en fermentation, a été surchauffé ou qui a une faible diastase ou une teneur légèrement trop élevée en hydroxyméthylfurfural par rapport aux normes ". Une telle qualité de miel est admise pour une utilisation industrielle, car le miel est souvent stérilisé pour des raisons d'hygiène.
4. Le projet européen stipule qu'aucun des constituants essentiels du miel ne peut être enlevé. La formulation dans le paragraphe 3.2 du Codex est différente : "Le miel ne peut être traité de manière à ce que sa composition soit fondamentalement modifiée".

Le pollen est un des constituants essentiels du miel peut être interprétée de différente manière. Du point de vue alimentaire, il ne joue aucun rôle, car la teneur en pollen représente moins de 0,01%. Cependant, le pollen est important pour déterminer l'origine botanique et géographique du miel. Le miel est parfois aussi utilisé pour la désensibilisation au pollen en raison de sa faible teneur en pollen. L'industrie du miel prétend qu'un filtrage fin est souvent nécessaire pour éloigner les petits corps étrangers qui altèrent la qualité du miel. Cependant le miel qui a été soumis à un filtrage minutieux afin d'améliorer sa limpidité, doit être muni d'une étiquette afin d'y rendre le consommateur attentif. La meilleure solution serait d'ajouter un paragraphe qui stipulerait que le miel doit être filtré à l'aide d'un filtre dont la grandeur des pores est supérieure à 0,2 mm. **(PIRO.R, MUTINELLI. F, 2003) ; (CORNELIS M et JOURET M, 2001) ; (PERSANO. et AL, 1995)**

## **8. CRITERES DE QUALITE SPECIFIQUES**

### **8.1. TENEUR EN EAU**

Tant le *Codex Alimentarius* que la norme de l'UE prescrivent actuellement une teneur en eau maximale de 21%. Le miel qui contient une teneur en eau élevée fermente plus facilement. Les deux projets proposent de maintenir la valeur maximale de 21 g d'eau/100 g de miel. Comme l'ont montré des mesures effectuées ces dernières années, l'exception pour le miel de trèfle n'est pas justifiée. En effet, la teneur en eau maximale du miel de trèfle devrait aussi être de 21 g / 100 g, car en pratique, des valeurs aussi élevées sont rarement atteintes. En Suisse, la norme de 20 g / 100 g a fait ses preuves pendant les vingt dernières années jusqu'à la dernière révision de l'Ordonnance sur les denrées alimentaires dans laquelle la valeur maximale de l'Union européenne (21 g/100 g) a été reprise. Un grand nombre d'organisations apicoles nationales (par exemple en Allemagne, Belgique, Autriche, Italie, Suisse, Espagne) ont des valeurs maximales pour la teneur en eau de 17,5 à 18,5 g/100 g pour les catégories spéciales du miel de qualité. Les contrôles chimiques effectués jusqu'à aujourd'hui pour le miel de qualité (FSSA : Fédération Suisse de Sécurité Alimentaire) ont montré que la teneur en eau de plus de 95% des miels est inférieure à la valeur prescrite de 18,5%. **(PERSANO. et AL, 1995) ; (PIAZZA M.G ET AL, 1991)**

## **8.2. TENEUR EN SUCRES RÉDUCTEURS ET SACCHAROSE APPARENT**

La teneur en sucres réducteurs et saccharose apparent n'a pas une signification pour la détermination de la qualité du miel. Voilà pourquoi cette norme doit être remplacée par une norme concernant les sucres spécifiques. **(PIRO.R, MUTINELLI. F, 2003)**

## **8.3. TENEUR EN SUBSTANCES INSOLUBLES DANS L'EAU**

En mesurant les substances insolubles dans l'eau, on peut déterminer les impuretés dans le miel. La valeur proposée est semblable à l'ancienne valeur qui, elle, provient de l'époque où une partie importante des miels récoltés aux quatre coins du monde était extraite par pressage des rayons. Aujourd'hui, la quasi-totalité des miels que l'on trouve dans le commerce est extraite par centrifugation. Le maxima de 0,1 g/100 g autorisé par les normes du *Codex Alimentarius* et de l'Union européenne nous paraît trop élevé. Souvent, ce sont des valeurs plus faibles qui sont déterminées et qui se trouvent entre 0,005 et 0,05 g/100 g.

Il n'est malheureusement pas possible, par la méthode prescrite, de mesurer la quantité de cire, impureté insoluble dans l'eau se trouvant en quantité relativement importante dans le miel. **(BOGDANOV.S, 1996)**

## **8.4. TENEUR EN SUBSTANCES MINÉRALES (CENDRES)**

La teneur en cendres est un critère de qualité qui dépend de l'origine botanique du miel : le miel de nectar à une teneur en cendres plus faible que le miel de miellat. La détermination de la teneur en cendres est remplacée par la mesure de la conductivité électrique. La teneur en cendres pourrait être maintenue provisoirement jusqu'à ce que la conductivité électrique soit reconnue comme norme internationale. **(PERSANO *et al*, 1995)**

## **8.5. ACIDITÉ**

L'acidité est un critère de qualité important. La fermentation du miel provoque une augmentation de l'acidité dans le miel, c'est pourquoi une valeur maximale est très utile, bien qu'il existe une fluctuation naturelle considérable. L'ancienne norme prescrit une valeur maximale de 40 milliéquivalents/kg. Dans le projet du *Codex Alimentarius*, elle a été augmentée

à 50 milliéquivalents/kg, étant donné qu'il existe quelques sortes de miels qui ont une teneur naturelle en acide plus élevée. **(BOGDANOV et Al, 2004) ; (HORN et LÜLLMANN, 1992).**

#### **8.6. ACTIVITÉ DE LA DIASTASE**

L'activité de la diastase, enzyme du miel, est un facteur de qualité, qui est influencé par le stockage et le chauffage du miel et qui est par conséquent un indicateur de fraîcheur et de surchauffage du miel. Bien que l'activité de la diastase ait une large fluctuation naturelle, il s'est révélé que l'indice diastasique minimal actuel de 8 est adéquat. Lors de l'interprétation des résultats de l'activité diastasique, il faut tenir compte du fait que certains miels mono floraux ont une activité diastasique naturellement basse. Bien que les projets de l'Union européenne et du *Codex Alimentarius* proposent une même valeur pour l'activité minimale de la diastase, il existe une différence importante : alors que dans le projet du Codex, la valeur prescrite est valable lors de la mise en pot, dans le projet de l'Union européenne, elle est valable pour l'ensemble des miels du commerce. Cela signifie que la norme européenne est plus sévère, car plus le stockage est long, plus l'activité de la diastase diminue. **(PIRO.R, MUTINELLI. F, 2003) ; (PERSANO et al, 1995)**

#### **8.7. TENEUR EN HYDROXYMETHYLFURFURAL**

Cet important facteur relatif à la qualité du miel est lui aussi un indicateur pour la fraîcheur et le surchauffage du miel. Le miel brut ne contient pratiquement pas d'hydroxyméthylfurfural (HMF), cependant sa teneur augmente au cours du stockage en fonction du pH du miel et de la température de stockage.

Quelques associations européennes d'apiculteurs (Allemagne, Belgique, Italie, Autriche, Espagne) vendent une partie de leur miel en tant que "miel de qualité" avec un taux maximal de 15 mg/kg. Jusqu'à présent, le contrôle chimique de la FSSA a montré que le taux de HMF de plus de 95% des miels est de moins de 15 mg/kg. Dans le commerce international, un taux maximal de 40 mg/kg s'est révélé acceptable. La proposition du Codex prévoit un taux maximal de 60 mg/kg. Cette proposition d'un taux maximal plus élevé se base sur le fait que, dans les pays chauds, la teneur en HMF du miel augmente plus rapidement avec la durée de stockage. La proposition la plus récente de l'UE exige un taux maximal de 40 mg/kg vu que cette norme s'est révélée réaliste pour les conditions européennes. Il existe encore une autre différence entre les

deux propositions. Comme c'est le cas pour la diastase, la teneur du *Codex Alimentarius* est valable lors de la mise en pot alors que la proposition de l'UE est valable pour l'ensemble des miels du commerce. Vu que le taux de HMF continue d'augmenter avec la durée de stockage, la proposition de l'UE est beaucoup plus sévère que celle du *Codex Alimentarius*. **(COMMISSION INTERNATIONALE DU MIEL, 2012) ; (JEAN. P, 2005) ; (PIAZZA M.G ET AL, 1991)**

## **8.8. TENEUR EN SUCRES SPÉCIFIQUES**

D'après **BOGDANOV *et al* (1999)**, on peut proposer une valeur pour la somme des teneurs en fructose et glucose d'au moins 60 g/100 g pour tous les miels de nectar et de 45 g/100 g pour tous les miels de miellat. Pour ce qui est du saccharose, la situation est plus compliquée. Dans ce cas, la norme générale de 5 g/100 g serait remplie par plus de 99% des miels analysés à l'exception de quelques miels mono floraux.

L'introduction d'une norme relative à la teneur en sucres spécifiques aura des conséquences positives supplémentaires pour le contrôle de routine du miel. Actuellement, on analyse la teneur en sucres réducteurs des échantillons de miels prélevés dans le commerce par rapport à sa conformité avec la norme. Mais cela n'en dit pas long sur la qualité du miel. Cependant, les sucres spécifiques du miel sont analysés pour obtenir des renseignements concernant différents aspects de la qualité du miel.

Ainsi, le rapport fructose/glucose et la concentration de saccharose sont de bons critères pour différencier les miels mono floraux. La teneur en oligosaccharides tels que le mélézitose et le maltotriose sont de bons indicateurs pour la teneur en miellat d'un miel. Le spectre de sucres spécifiques donne des renseignements sur l'authenticité du miel et la falsification des sucres. **(BOGDANOV.S, 1996)**

## **9. FACTEUR QUALITATIF SUPPLÉMENTAIRE EN DEHORS DES NORMES**

### **9.1. ACTIVITÉ DE L'INVERTASE**

L'enzyme du miel "invertase" est particulièrement sensible à la chaleur et au stockage. Il fait office d'indicateur de fraîcheur. Il a été proposé de donner un indice d'invertase supérieure à 10 aux miels frais et non chauffés ; pour les miels qui ont une activité enzymatique peu élevée, un indice de plus de 4 est recommandé. Bien que l'activité de l'invertase dans le miel, tout comme

l'activité de la diastase, est sujette à une grande variation naturelle, son utilité pour le contrôle de la qualité du miel a été prouvée. En Allemagne, en Belgique et en Espagne, les associations d'apiculteurs utilisent l'indice d'invertase dans leurs normes relatives au miel comme indication du degré de fraîcheur. Jusqu'à présent, le contrôle chimique du miel de qualité de la FSSA a montré que l'indice d'invertase de plus de 95% des miels est supérieur à 10. **(PERSANO et al ,1995)**

## **9.2. VALEUR DU pH**

Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5, elle est due à la présence des acides organiques **(BOGDANOV et Al ,2004)**. Selon **SCHWEITZER (2005)**, les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellat, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

## **9.3. CONTAMINATION PAR LES ANTIBIOTIQUES**

### **9.3.1. Contamination verticale**

Il est normal et souhaitable de soigner les colonies atteintes de maladies. S'il existe des médicaments vétérinaires dans l'Union Européenne pour traiter les varroas, il n'en va pas de même pour le traitement des loques ou de la nosérose. Les cas de nosérose sont fréquents. Pendant des années, nous avons utilisé de la fumagiline (commercialisée sous le nom de Fumidil B). Aujourd'hui, ce produit n'est plus autorisé. Quelles que soient les précautions prises par les apiculteurs lors de l'utilisation d'un produit antibiotique dans la ruche, on va très probablement en retrouver à l'état de traces dans le miel, ou même à des doses plus importantes. Dans ce cas, on est confronté à une présence de résidus de médicaments vétérinaires dans le miel. Cette pollution liée aux pratiques apicoles est dite verticale et doit être maîtrisée. De plus, un apiculteur qui utilise ce type de produits risque de contaminer tous les ruchers voisins dont les abeilles viendraient piller le miel des colonies affaiblies par la maladie.

#### **9.3.1.1. Principales maladies qui touchent les abeilles**

Les principales maladies de l'abeille pour lesquelles sont indiqués les antibiotiques, sont les loques américaines et européennes, toutes deux, dues à des bactéries ainsi que dans la lutte contre la nosérose, cette dernière étant provoquée par un protozoaire. **(BARBANÇON, 2001) ; (BARBANÇON, 2002)**

Contre la nosémoze, le seul antibiotique dont l'efficacité soit reconnue est la fumagilline, (FUMIDIL B®). La spécificité et le prix de ce dernier médicament contribuaient en grande partie à limiter son utilisation à sa seule indication, mais depuis janvier 2000, il n'est plus commercialisé.

Il n'en va malheureusement pas ainsi contre les loques où l'on a encore tendance à pratiquer ce que l'on appellera pudiquement des traitements de précaution. Mais où en sommes-nous avec l'emploi raisonné de l'antibiothérapie en apiculture ? En toute logique et d'une façon idéale pour lutter contre un germe pathogène, le thérapeute se devrait d'employer l'antibiotique pour lequel le ou les germes (bactéries) sont sensibles. En médecine humaine ou vétérinaire, dans la plupart des maladies infectieuses, une recherche sur l'agent infectieux est effectuée à la suite d'un prélèvement qui permet en laboratoire :

- l'identification et le typage des bactéries en cause après mise en culture
- puis : antibiogramme, grâce auquel on teste la sensibilité ou la résistance du germe concerné face à une palette d'antibiotiques : petites pastilles de papier imprégnées des différents antibiotiques que l'on pose sur les cultures microbiennes.

Au vu du résultat de ces recherches, le praticien (médecin, vétérinaire) prescrit la substance anti-infectieuse qui semble la plus performante. Voilà la démarche idéale, hélas, malgré cette rigueur, le praticien constate quelquefois des distorsions entre ce qui s'est passé in vitro (au laboratoire) et les résultats obtenus in vivo sur le(s) patient(s). Mais ici, tout a été fait dans les règles de l'art : diagnostic clinique et paraclinique. **(BARBANÇON, 2002) ; (BARBANÇON, 2001)**

#### 9.3.1.2. traitement

La vulgarisation et les habitudes ont fait que depuis des années une seule et même famille d'antibiotiques est préconisée : celle des cyclines (tétracycline, oxytétracycline). Pourtant, depuis, la chimie des antibiotiques a fait des progrès et bien d'autres substances ont fait leur apparition, sans compter que d'anciens bactéricides présentent encore un intérêt en matière d'efficacité. Autre fait marquant : dans certains pays où l'on pratique des antibiogrammes sur le bacille loqueux, des résistances de ce germe aux tétracyclines ont été établies ainsi que des

sensibilités à d'autres antibiotiques. Certaines souches de *Bacillus larvae* ont donc bien pu, au fil des années, développer une résistance aux tétracyclines, un peu comme *Varroa jacobsoni* l'a fait vis-à-vis du fluvalinate.

En dehors de ces phénomènes de résistance face à un antibiotique, un autre aspect de l'utilisation de telles substances en apiculture est trop souvent négligé : c'est celui de leur forme galénique où des notions comme la solubilité dans l'eau, la durée de vie active, pH de milieu requis, entrent en ligne de compte. **(BARBANÇON, 2001)**

Rappel du traitement de la loque américaine :

- Rappel du traitement de la loque américaine
- Traitement antibiotique + transvasement
- Réduction à l'état d'essaim nu, claustration et installation en ruche désinfectée et sur cires non infectées : antibiotique non obligatoire ici ; certains de nos anciens guérissaient la loque américaine de cette façon-là il y a 400 ans et ne disposaient pas d'antibiotiques. **(BARBANÇON, 2002)**

### **9.3.2. Contamination horizontale**

La pollution horizontale est liée à la présence d'antibiotiques dans l'environnement. Le miel est récolté par les abeilles dans la nature qui elle-même n'est pas exempte de contaminants, en particulier du fait de l'utilisation en agriculture de certains produits qui peuvent se dégrader en antibiotiques (par exemple, les Suisses ont montré que l'herbicide Asulam se dégrade en sulfanilamide et peut contaminer le miel jusqu'à plus de 200 ppb). Au cours de leur activité de butinage, les abeilles sont également susceptibles de recueillir des antibiotiques utilisés en vergers. Suite à des traitements phytosanitaires des vergers contre le feu bactérien réalisés en Allemagne sur fruitiers, on a retrouvé jusqu'à plus de 100 ppb de Plantomycine dans les miels. Certains problèmes ont été rencontrés avec le produit Fructocin utilisé sur poiriers. Même si c'est en très faible quantité, il est également possible de retrouver à proximité de lisiers des antibiotiques venant des déjections de bétail traité, ou encore d'autres sources moins bien identifiées. Ce type de contamination ne peut pas être contrôlé par l'apiculteur si ce n'est en évitant les zones à risque, pour autant qu'elles soient clairement identifiées. **(BRUNEAU, 2006)**

### 9.3.3. Transmission des antibiotiques dans le miel

Lors des transformations du miel dans le jabot de l'abeille, les antibiotiques ne sont pas digérés comme c'est le cas lors de la digestion pour le bétail. Pour cette raison, afin que les consommateurs n'en consomment pas, il est impossible d'utiliser les antibiotiques au rucher. Les abeilles sont un parfait miroir de tous les résidus de leurs nourritures et ce sont les analyses au laboratoire qui les mettent en évidence.

**(VERNIER. V, 2008)**

#### 9.3.3.1. Modalité de Transmission des Antibiotiques dans Le Miel

Les principales contaminations ont lieu lors du traitement des ruches pour lutter contre les maladies des abeilles :

- la loque américaine et la loque européenne. : C'est pour cela que les antibiotiques sont les principaux contaminants du miel. Nous y accorderons une importance toute particulière. L'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre la loque américaine ne constitue pas un moyen approprié, car cela permet uniquement, en effet dès qu'on arrête la distribution de l'antibiotique la maladie se déclare à nouveau ;
- Feu bactérien : les ouvrières butinant à proximité des verges traitées contre le feu bactérien peuvent entrer en contact avec de la Streptomycine utilisée contre la bactérie *Erwinia amylovora*. En 2008, le recours effectif à la streptomycine ne sera finalement autorisé que si le feu bactérien présente un fort risque d'infection pendant la floraison des arbres fruitiers. L'utilisation sera autorisée par les cantons qui se baseront sur un système d'alerte. Le miel ne peut plus être mis en circulation dès qu'il contient des résidus de streptomycine supérieurs à 0.01 mg/kg. **(ANONYME 2, 2008)**. La limite légale est de : **10 µg/kg** ;
- L'élevage : les abeilles peuvent parfois s'abreuver dans les purins issus des élevages. Par conséquent une contamination est possible si le bétail a subi des traitements préalables aux antibiotiques. En 2004, le centre de recherche apicole a conclu que le risque de contamination est très faible. **(RITCHER, D ET AL, 2005)**

### 9.3.3.2. Résidus d'antibiotique dans le miel

Les molécules utilisées sont initialement la tétracycline et l'oxytétracycline. **(ANDRE. S, AGRIRESEAU, 2002)**. Cependant, le développement de souches résistantes à ces molécules aux États-Unis et au Canada, ont conduit les apiculteurs à se tourner vers d'autres antibiotiques comme la tylosine et la lincomycine, Streptomycine, utilisés en apiculture pour la lutte contre la loque des abeilles. Les antibiotiques de cette classe agissent en se fixant sur les ribosomes (précisément sur la sous-unité 30s dans le cas de streptomycine). Le seuil limite de streptomycine dans le miel est de **10 µg/kg**.

Des recherches sont effectuées pour rechercher des antibiotiques actifs, par exemple la Tilmicosine du groupe des macrolides **(ALIPPI. AM Et Al, 2007) ; (ELZEN, J. Et Al, 2002)**.

Cependant, la présence de résidus d'antibiotique est souvent liée à l'utilisation de posologies supérieures lors d'apparition d'antibiorésistance ou à des utilisations intempestives, mais elle est surtout due au fait que certains apiculteurs augmentent les doses dans l'espoir d'une action stimulante. Le problème de la présence d'antibiotique est d'une importance cruciale, car le miel est souvent consommé tel quel cru, sans transformation. Chez l'homme pris en quantité suffisante ou de façon répétée, les résidus sont susceptibles d'induire des allergies des troubles intestinaux et plus graves des antibiorésistances. **(DESCHAMPS.VC, 1998)**

### 9.3.4. Méthodes utilisées pour la détection des résidus d'antibiotiques

Plusieurs méthodes ou appareillages sont utilisés. Les méthodes les plus économiques (Elisa et Charm-Test) sont aussi les moins fiables. C'est la raison pour laquelle tout résultat positif obtenu ainsi est systématiquement validé ensuite par l'HPLC que personne ne conteste.

Pour les antibiotiques " classiques " (streptomycines, sulfonamides, tétracyclines), on est passé en quelques années d'un seuil de détection de 500 PPB (0.5g/tonne) à 10 PPB (0.01g/tonne). Ceci pour les analyses de routine. Il est possible de descendre beaucoup plus bas si nécessaire. **(PIRO.R, MUTINELLI. F, 2003)**

Pour le chloramphénicol, antibiotique prohibé en médecine vétérinaire tant en Europe qu'aux États-Unis, les enjeux sont différents puisqu'il s'agit d'une molécule classée à haut risque. En conséquence, même les analyses de routine offrent un seuil de détection beaucoup plus bas : 0,3PPB (0,0003 g/tonne). **(ORTELLI. D, EDDER. P ET CORVI. C, 2004)**

C'est sur la base de ces analyses qualifiées par la presse apicole de " non fiables " et " non validées " que l'Union européenne a bloqué les importations de toutes les productions animales d'origine chinoise. (Miel, volailles, lapins, mollusques, crevettes, crustacés et même les aliments pour chiens et chats).

Le 25 janvier 2002, soit quatre jours avant la 71ème assemblée générale du SPMF à Samatan, la commission de Bruxelles a décidé l'arrêt total des importations de miels chinois **(acte n° 2002/69/CE du 30 janvier 2002)**. Cette décision est consécutive à la découverte de résidus de chloramphénicol dans le miel. **(REYBROECK, 2003)**

Il existe actuellement deux méthodes pour analyser les antibiotiques : la première, la moins coûteuse, est le screening qui montre les échantillons positifs ; la seconde, la plus onéreuse, est une méthode quantitative qui mesure exactement la quantité d'antibiotiques. Nous recommandons aux apiculteurs d'utiliser la méthode du screening qui se base sur le test de Charm. Tous les trois groupes de substances (sulfonamides, tétracyclines et streptomycines) peuvent être décelés au travers de celui-ci. Si le résultat de ce test est négatif, on peut en conclure que le miel ne contient pas d'antibiotique. En cas de résultat positif, il faut le confirmer par une analyse quantitative. D'après les données dont on dispose jusqu'ici, le plus grand danger provient des sulfonamides. **(SABATINI. À G et al, 2003)**

### **9.3.5. Doses tolérables**

Pour la plupart des antibiotiques utilisés contre les loques (Oxytétracycline par exemple) la dose administrée est de 1,5 gramme de matière active par colonie. Soit trois fois 0.5 gramme/ruche, à 8 jours d'intervalle. D'autres posologies ou techniques sont également possibles. Il s'agit simplement d'essayer, par un calcul simple, de " visualiser " ce que l'on entend aujourd'hui par " résidus ").

300 grammes de matière active sont donc nécessaires pour traiter 200 ruches.

Si on admet une moyenne de 20 kg, ces 200 ruches récolteront au total quatre tonnes de miel (4 000 kg). **(REYBROECK, 2003)**. Il suffira donc qu'une seule de ces ruches déplace du corps dans la hausse 0,1 gramme d'antibiotique non consommé, pour polluer la totalité de la récolte à hauteur de 25 ppb. En supposant une hétérogénéité parfaite, si chaque ruche remonte 0,0005g (soit 0,5 mg ou 0,033% de la dose administrée) on obtiendra la même pollution de 25 ppb.

En l'absence de LMR, il n'est tenu compte en ce moment que de la limite de détection des laboratoires, soit 10 ppb. En conséquence, ces 4 tonnes de miel devraient normalement être retirées du marché. Compte tenu des pratiques apicoles actuelles, il n'est donc pas étonnant, même en l'absence de pollution extérieure, que l'on retrouve fréquemment des résidus dans le miel. **(NANETTI. À *et al*, 2003)**

Il existe des variantes :

Si 10 ruches remontent chacune 0,1g, on arrive à 250 ppb.

Si les 200 ruches récoltent 40 kg au lieu de 20, on est à 12,5 ppb.

Si on ne traite qu'une ruche et qu'elle remonte 0,1g, toutes choses égales par ailleurs, on obtient le même niveau de 25 ppb.

Il n'est pas besoin d'aller chercher des échappatoires auprès des traitements contre le feu bactérien ou les élevages industriels de cochons, poulets ou autre.

Les pratiques apicoles actuelles suffisent largement pour expliquer la présence de résidus d'antibiotiques dans un pourcentage considérable d'échantillons. **(ORTELLI. D, EDDER. P ET CORVI. C 2004) ; (NANETTI. À *et al*, 2003) ; (BOGDANOV, 1999)**

# TROISIÈME CHAPITRE : RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

## 1. GÉNÉRALITÉS

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux antibiotiques reçus par l'animal de son vivant. La définition de résidus est codifiée dans une directive européenne (**DIRECTIVE 81/851/ CEE, 1981**). Dans cette Directive, les résidus sont définis comme étant «*tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré*». Le **règlement 2377/90/CEE** modifie légèrement cette définition en la complétant : les résidus sont définis comme toute substance pharmacologiquement active, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux.

Avant les années 1980, les méthodes de détection des résidus dans les viandes étaient relativement peu sensibles. Les Services vétérinaires menaient alors, afin de protéger la Santé publique, une politique de zéro résidu (**PRANDL, 1973**) ; (**MILHAUD, PERSON, 1981**). Si une carcasse ou une pièce de viande était contrôlée positive aux résidus d'antibiotiques, elle était saisie et déclassée.

Au début des années 1980, les progrès techniques ont permis un bond spectaculaire dans les méthodes de détection avec notamment le développement de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou en anglais HPLC). La politique du zéro résidu n'était alors plus tenable, car des quantités infimes de résidus étaient presque systématiquement détectées.

Ces quantités détectées étaient si faibles dans la grande majorité des cas qu'il devenait important d'évaluer le danger qu'elles représentaient vraiment pour la Santé publique.

Deux notions très importantes sont alors apparues dans la réglementation, afin de compléter celle de résidus : la notion de Dose Sans Effet (DSE) et la notion de Limite Maximale de Résidus (LMR ou en anglais MRL).

## 2. DEFINITION

Les résidus d'antibiotiques sont définis comme toutes substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse des principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restants dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré (**Article 1, point 1, du règlement (CEE) n°2377/90**), (**MILHAUD et PINAULT, 1999**) ; (**MEVIUS. D-J et al,1999**)

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. (**CHATAIGNER. B et al, 2002**)

"Le résidu est le produit chimique se trouvant à l'intérieur des produits d'origine animale et de l'animal lui-même".

La quantité d'un résidu s'exprime en partie par millions (ppm ou mg/kg), 20ppm d'un antibiotique quelconque, cela représente 20 grammes de cet antibiotique par tonne d'aliments ou 20mg par kilogrammes d'aliment. (**FERRANDO, 1966**)

Ce sont toutes les substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse des principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restants dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré (Article 1, point 1, du règlement **CEE n°2377/90**). (**KÖLBENER et al, 2005**) ; (**POULIQUEN et Le BRIS, 2001**) ; (**MILHAUD et PINAULT, 1999**)

## 3. ANTIBIOTIQUES EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

Les antibiotiques sont la principale classe de médicaments vétérinaires utilisés depuis les années 50 pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne chez les animaux producteurs de denrées alimentaires et les animaux de compagnie. Les substances utilisées appartiennent aux mêmes familles que celles utilisées en médecine humaine. (**SANDERS, P. et**

*al*, 2011). Ces médicaments sont utilisés pour prévenir et traiter des maladies infectieuses pouvant entraîner une morbidité importante et être associées à la mortalité. Les affections les plus souvent traitées sont digestives et respiratoires. **(CAZEAU, G. et al, 2010)**

En médecine vétérinaire, il existe quatre usages possibles des antibiotiques, chacun ayant un objectif précis. **(SCHWARZ, S. et al. 2001) ; (KEHRENBURG, C. et al, 2001).**

### **3.1. USAGE CURATIF**

L'usage curatif ou thérapeutique consiste à traiter individuellement les animaux qui présentent des signes cliniques d'infection, c'est-à-dire à traiter une infection bactérienne existante. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison de ces animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. En général, le traitement est individuel et il est mis en œuvre chez les animaux domestiques, et les grands animaux de rentes (vaches laitières). Le plus souvent, le traitement antibiotique est donné par voie orale ou par voie parentérale. Dans le cas d'une antibiothérapie de type curative, à l'initiation du traitement, il est généralement admis que la charge bactérienne est importante. **(PHILLIPS. I Et Al ,2004) ; (KONIG, C. et al, 1998)**

### **3.2. USAGE AU TITRE D'ADDITIFS**

Les antibiotiques peuvent être utilisés dans l'aliment au titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux, sans que les mécanismes à l'origine de l'amélioration de ces performances aient été clairement élucidés. **(DIBNER, J. et al ,2005).** Cet usage fait l'objet de nombreuses critiques et il est totalement interdit au sein de l'Union européenne depuis 2006. **(SOULSBY. L, 2007).**

### **3.3. USAGE PROPHYLACTIQUE**

Les antibiothérapies prophylactiques sont mises en place lors de situations critiques c'est-à-dire lors de présence d'un facteur de risque très souvent associé au développement d'infections. Il s'agit notamment de périodes associées à un stress comme lors de transports, de regroupement d'animaux provenant d'élevages divers ou du sevrage, mais aussi lors de traitements chirurgicaux. Elles peuvent être appliquées de façon individuelle ou sur un groupe d'animaux. Les animaux traités ne présentent alors aucun signe clinique d'infection, mais la connaissance a

priori des infections se développant dans ces situations permet de choisir une classe d'antibiotique adaptée à la prévention des infections dues aux bactéries les plus fréquemment rencontrées. La principale différence entre la métaphylaxie et la prophylaxie est que lors d'une prophylaxie il n'y a pas encore de germe impliqué, mais seulement un facteur de risque (**DIBNER, J. et al ,2005**).

### **3.4. ANTIBIOTIQUES VÉTÉRINAIRES AUTORISÉS**

Dans l'Union Européenne (UE), la liste des antibiotiques pouvant être utilisés comme médicaments vétérinaires fait partie des substances répertoriées dans l'annexe 1 du règlement de la Commission (**UE**) **37/2010**. Les médicaments utilisables en médecine vétérinaire, contenant ces antibiotiques autorisés, sont ceux ayant satisfait au processus d'autorisation de mise sur le marché (AMM) par l'Autorité compétente à l'échelle nationale ou européenne. Ainsi, après l'évaluation des données scientifiques prouvant l'efficacité du produit et son innocuité pour la santé humaine et animale ainsi que pour l'environnement, l'Autorité compétente autorise son importation, sa distribution, et son utilisation. (**MESSOMO NDJANA. F, 2006**).

### **3.5. NATURE ET PROPRIÉTÉS 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.

#### **3.5.1. 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.

### **3.5.2. 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)**.

## **4. DELAI D'ATTENTE**

### **4.1. DEFINITION**

Selon l'article L. 617-2 du Comité de la Santé publique (CSP) de l'Union Européenne (CEE), le temps d'attente est défini comme suit : « Il faut entendre par temps d'attente, le délai à observer entre la dernière administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'obtention des denrées alimentaires provenant de cet animal, afin de garantir qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux limites maximales établies par le règlement n° 90-2377 (CEE) ». **(MILHAUD et PINAULT 1999)**

Le délai d'attente ou période de retrait représente le temps nécessaire à l'excrétion complète d'un médicament après sa dernière prise **(BROES et al, 1999)**.

C'est aussi le délai à observer entre l'administration du médicament à un animal dans les conditions normales et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal pour garantir que ces denrées alimentaires ne contiennent pas de résidus pouvant présenter des dangers pour la santé du consommateur. **(MILHAUD, 1978)**

Les délais d'attente indiqués sur les notices qui accompagnent les produits sont valables pour les doses recommandées par le fabricant. Lorsque des doses supérieures sont prescrites par le vétérinaire, le délai d'attente est prolongé et on doit tenir compte de ce qui est inscrit sur l'ordonnance. **(BROES *et al*, 1999)**

#### **4.2. FIXATION DU TEMPS D'ATTENTE**

Pour fixer le temps d'attente d'une substance, il faut dans ce cas étudier son métabolisme pour connaître les lieux d'accumulation et les voies d'excrétion du composé de départ et de ses métabolites et étudier leur décroissance en fonction du temps.

Ceci nécessite une première investigation avec des molécules marquées, puis de nombreux travaux complémentaires pour identifier les métabolites et mettre au point des méthodes non radioactives pour les doser. Les différents temps d'attente proposés devront assurer qu'il n'y a pas de résidus mesurables dans les productions de l'animal vivant (lait, œufs, miel) ou dans les denrées alimentaires obtenues après l'abattage. **(MILHAUD, 1978)**

Le temps d'attente définit ainsi la durée pendant laquelle l'animal traité ne doit pas être abattu ou les denrées alimentaires produites par l'animal traité (lait, œufs, miel) ne peuvent être commercialisées en vue de la consommation humaine. **(BEN YOUSSEF, 2013)**

##### **4.2.1. modalités de détermination du temps d'attente (TA)**

Le TA est calculé en utilisant les résultats des études pharmacocinétiques de déplétion des résidus, réalisées sur un nombre suffisant d'animaux, recommandé par la ligne directrice.

Il est en effet indispensable que les instances d'évaluation des divers pays aient un même mode de jugement. Il est impératif d'éviter des divergences d'appréciations pouvant les conduire à fixer des temps d'attente différents pour une même spécialité susceptible de provoquer un blocage du processus de reconnaissance mutuelle, une entrave à la libre circulation des

médicaments et, par ailleurs, susciter de la perplexité chez les utilisateurs. **(SACHOT. E, PUYT. J-D 2001) ; (MILHAUD et PINAULT, 1999)**

Les délais d'attente indiqués sur les notices qui accompagnent les produits sont valables pour les doses recommandées par le fabricant. Lorsque des doses supérieures sont prescrites par le vétérinaire, le délai d'attente est prolongé et on doit tenir compte de ce qui est inscrit sur l'ordonnance.

Historiquement, les scientifiques ont d'abord considéré qu'il n'était pratiquement pas possible d'établir des LMR, notamment pour les antibiotiques, et certains préconisaient d'utiliser la CMI (concentration minimale inhibitrice) comme limite de tolérance **(NOUWS, 1979)**. Pour les médicaments vétérinaires contenant un ou plusieurs principes actifs antibiotiques, un temps d'attente était établi de manière à ce qu'aucun résidu ne soit décelable par la méthode de dosage la plus sensible dans la viande, les abats, le lait et les œufs. **(MILHAUD. PERSON, 1981)**

Ce n'est qu'au début des années 1980 que le calcul du temps d'attente fut lié aux études de déplétion des résidus dans les tissus animaux et plus tard aux LMR.

#### 4.2.1.1. METHODE CLASSIQUE

La plus simple, consiste à fixer comme temps d'attente, le délai nécessaire pour que tous les tissus, de tous les animaux d'essai, présentent une teneur en résidus inférieure à la LMR fixée pour chacun d'eux. Certains États ajoutent un délai complémentaire de sécurité, si par exemple on constate une grande variabilité des cinétiques de déplétion entre les animaux. Ce délai de sécurité peut être estimé à 10 à 30 % du délai précité, ou 1 à 3 fois la demi-vie d'élimination  $t_{1/2}$ , dans tous les cas au moins 1 à 2 jours. **(SACHOT. E et PUYT. J-D , 2001) ; (MILHAUD et PINAULT 1999)**

#### 4.2.1.2. Nouvelle méthode proposée

Cette nouvelle méthode utilise une approche statistique se basant sur des principes de pharmacocinétique bien établis. Elle considère que l'élimination des résidus correspond à un

modèle cinétique mono compartimental, la décroissance des concentrations en fonction du temps pouvant être décrite de manière satisfaisante par une équation mono exponentielle. Il est alors possible de déterminer le temps d'attente par une analyse de régression linéaire du log de la concentration en fonction du temps. Le principe est de calculer le temps, au terme duquel on peut garantir, avec des limites de confiance préétablies (par exemple 95 %), que la droite de régression des concentrations correspondant par exemple au 95<sup>ème</sup> percentile supérieur des valeurs mesurées passera au-dessous de la LMR. Cette seconde méthode nécessite un nombre d'animaux plus élevé que la première. **(SACHOT. E, PUYT. J-D 2001) ; (MILHAUD et PINAULT 1999)**

## **5. LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS**

### **5.1. DÉFINITIONS**

Est la Concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, que la Communauté Européenne considère sans risque sanitaire pour le consommateur, et qui ne doit pas être dépassée dans les denrées alimentaires issues de l'animal traité pour être jugé propre à la consommation. Elle est indispensable à l'AMM (autorisation de mise sur le marché) de tout médicament vétérinaire destiné aux animaux de production. **(STOLTZ. R, 2008)**

Une limite maximale de résidus (LMR) est une concentration de résidus qui peut demeurer dans les tissus ou les produits alimentaires d'un animal destiné à l'alimentation à qui l'on a administré des médicaments vétérinaires. Cette limite représente la quantité de résidus qui peut être consommée quotidiennement par un être humain tout au long de sa vie sans que cela n'ait d'effets indésirables sur sa santé. **(LA VIGNE .JP, 2007) ; (ANONYME 2, 2008).**

La Limite Maximale de Résidus (LMR) est la concentration maximale en résidus exprimée en partie par million (ppm) ou parties par milliard (ppb) dans un produit (lait, viande, œufs, miel) que les scientifiques et les autorités considèrent sans risque sanitaire pour le consommateur et sans effet sur les processus de fabrication. Cette LMR ne doit pas être dépassée pour des aliments issus des productions animales. **(FABRE, 2006)**

La LMR correspond à la concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires. **(LAURENTIE ; SANDERS, 2002)**

Il s'agit de la concentration maximale d'un produit phytosanitaire agréé, retrouvée dans les aliments, matières premières ou aliments pour bétail. Le respect d'une LMR prouve aux autorités que le produit a été correctement appliqué. Ceci permet des échanges commerciaux sûrs entre pays.

Lorsque les limites en résidus sont dépassées, cela signifie que les recommandations d'utilisation n'ont pas été respectées et qu'il y a eu infraction à la loi. L'utilisateur peut être poursuivi en justice et la récolte saisie et détruite. Les LMR sont exprimées en milligrammes (mg) de résidus par kilogramme (kg) de produit récolté, ou en part par million (ppm). Des techniques comme la chromatographie (HPLC), couplée à la spectrométrie de masse, permettent de détecter des traces de résidus présents à des niveaux très faibles, de l'ordre de 0,01mg/kg.

Actuellement la législation européenne définit des limites maximales des résidus (LMR), et toute utilisation d'antibiotiques thérapeutiques en dépend (temps d'utilisation, période d'arrêt de traitement avant la récolte de miel). Des antibiotiques pour lesquels aucune LMR n'était acceptable ont été retirés par décision européenne C'est le cas du chloramphénicol et de nitroimidazoles. **(COPPET. D.E et BRUWER. H.B, 1959)**

## **5.2. FIXATION DE LA LMR**

La notion de LMR constitue un compromis entre les attentes des consommateurs et les contraintes des producteurs permettant, sans interdire l'utilisation des médicaments, leur utilisation en toute sécurité. Cette LMR est calculée en prenant en compte d'une part le risque toxicologique et, d'autre part, l'effet potentiel des résidus sur la flore digestive de l'homme.

La **LMR toxicologique** est définie pour assurer la sécurité du consommateur. Cette notion intègre tous les éléments liés à la toxicité de la molécule à court ou à long terme, quelle que soit la nature des effets observés sur l'individu ou sur sa descendance. **(FABRE, 2006)**

La **LMR bactériologique** est une limite qui vise, quant à elle, à garantir l'absence d'effet des résidus d'antibiotiques sur la flore digestive humaine. Elle est prise en compte indépendamment du fait que cette modification ait ou non un effet sur l'homme.

La **LMR finale** (officielle) prend la valeur la plus basse entre la LMR toxicologique et bactériologique. **(FABRE, 2006)**

Selon **Fabre (2006)**, la fixation de la LMR s'appuie sur trois notions essentielles :

- a) recherche de la **Dose Sans Effet (DSE)** sur l'animal par différents tests biologiques ;
- b) partant de cette DSE et de facteurs de sécurité (100 ou 1000), calcul d'une **Dose Journalière Admissible (DJA)** : consommation inférieure à 1 pour 100 ou pour mille de la concentration qui entraîne un effet ;
- c) partant de cette DJA, de la connaissance de la consommation alimentaire moyenne des habitants et de l'analyse de la répartition dans les différents tissus et organes, on calcule les LMR (lait, viande, miel).

Les résultats des études pharmacologiques et de toxicité permettent de déterminer une Dose Sans Effet (DSE), c'est-à-dire une dose qui ne montre pas d'effets toxicologiques ou pharmacologiques dans les différentes études. Ensuite, cette DSE est divisée par un facteur de sécurité (100 à 1000) selon le profil toxicologique de la molécule pour aboutir à la Dose Journalière Admissible (DJA) :

- Dose Sans Effet toxique (DES) : dose la plus élevée d'une substance qui ne provoque pas de modification distincte de celles observées chez les animaux témoins.
- Dose Sans Effet (DES) microbiologique : concentration sans effet observé. Appréciation des modifications éventuelles de la flore digestive humaine.
- DES=Dose Journalière Admissible(DJA) quantité de résidus exprimés en mg/kg/Jr de poids corporel de l'homme ingérés quotidiennement pendant toute la vie sans risque d'effet appréciable sur sa santé. **(CODEX ALIMENTARIUS ,2011) ; (LAURENTIE et al, 2002)**

Les LMR fixées pour toutes les espèces animales sont les suivantes :

En se fondant sur les rations alimentaires utilisées par le Comité du *Codex Alimentarius* et par l'Union Européenne pour fixer les LMR de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments et sur une hypothèse maximaliste selon laquelle les denrées contiendraient des résidus à hauteur des LMR, il est possible de calculer la quantité maximale de résidus potentiellement ingérée **(VERNIER, V .2008)**

### **5.2.1. Dose sans effet**

Afin de quantifier la toxicité des résidus, on utilise la notion de Dose Sans Effet (DSE). La dose d'un principe actif est la dose expérimentale maximale, qui administrée régulièrement en per os pendant un temps suffisamment long, n'entraînant aucune manifestation toxique chez l'espèce la plus sensible selon des critères cliniques, biochimiques et anatomopathologiques.

Les protocoles ayant servi à déterminer La DSE d'un médicament avec son principe actif sont effectués sur quatre essais :

- De toxicité aiguë.
- De toxicité à moyen ou long terme, le principe actif est alors administré pendant une durée pouvant aller de trois mois à deux ans.
- De toxicité embry-foetale, et de carcinogénicité.

Les deux derniers essais ne sont conduits que sur les principes actifs suspectés d'avoir des propriétés tératogènes ou carcinogènes.

La dose d'un médicament peut être différente de la dose de ses résidus ou de ses métabolites. Elle peut servir de point de départ dans l'établissement de la DSE de ses résidus. En effet, il convient de prendre en compte le fait que les résidus correspondent pour partie au principe actif inchangé et pour une autre partie à l'ensemble de ses métabolites issus des biotransformations.

De la naît la notion de résidus totaux, elle est en général inférieure à la dose du médicament dans un rapport de 1/10 à 1/50. **(DZIEDZIC, 1988)**. Elle dérive de celle du principe actif en tenant compte de la proportion, variable avec en fonction du temps, du principe actif inchangé dans les denrées par rapport à ses métabolites, de la connaissance du métabolisme du médicament en recherchant ses métabolites dans les urines et les tissus et enfin d'études toxicologiques conduites sur certains métabolites synthétisés à cet effet.

Une condition s'impose : il faut que les métabolites soient peu nombreux et qu'on puisse les identifier et les synthétiser. **(STOLZT. R, 2008) ; (SYLVIER. B, 1984)**

### **5.2.2. Dose journalière admissible acceptable (DJA)**

La dose journalière admissible (DJA) (en anglais, *Acceptable Daily Intake* ou ADI) représente la quantité d'une substance qu'un individu moyen de 60 kg peut théoriquement ingérer quotidiennement (tout au long de sa vie), sans risque appréciable pour la santé. Elle est habituellement exprimée en mg de substance par kg de poids corporel. C'est à **René Truhaut** que revient le mérite de l'introduction du concept de DJA pour la première fois en 1961.

La DJA est à l'heure actuelle le meilleur outil pour exprimer la relation entre l'innocuité d'un additif et la consommation par l'homme. Elle représente une estimation de la toxicité chronique.

La DJA est calculée pour une substance, et ne tient pas compte d'effet synergique possible lorsque cette substance est associée à une autre. Son calcul est basé sur le seuil maximum de consommation au-delà duquel les premiers effets toxiques sont observables.

Ce seuil est aussi appelé *dose sans effet* (DSE) (ou NOAEL : No Observable Adverse Effect Level). La DSE est déterminée par les expérimentations animales ou bien humaines. On obtient alors la DJA en divisant par un facteur 100 à 1000 la DSE afin de prendre en compte les variations quand on extrapole de l'animal à l'homme. Ce coefficient de sécurité varie suivant la classification de la substance active, par exemple il est de 100 pour les composés non cancérigènes.

Une "DJA non spécifiée" est l'expression employée quand il n'est pas jugé nécessaire d'attribuer une DJA chiffrée à une substance. C'est le cas d'une substance dont les données des études toxicologiques, biochimiques et cliniques réalisées permettant de conclure que la consommation d'une substance, dans un aliment dans les proportions requises pour obtenir l'effet désiré, ne présentent pas de danger pour la santé. **(SYLVIER. B, 1984)**

### **5.2.3. Concentration admissible**

On obtient la concentration admissible en ventilant la dose journalière acceptable dans différentes denrées alimentaires, en tenant compte des habitudes alimentaires des consommations et de divers impératifs métaboliques. **(SYLVIER. B, 1984)**

### **5.2.4. Cadre réglementaire de la fixation d'une LMR**

Les LMR sont fixées au niveau européen conformément au **règlement CE n°470/2009** du 6 mai 2009 du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009. Celui-ci abroge le règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil en vue, entre autres, de restaurer la disponibilité des médicaments vétérinaires notamment pour les espèces mineures, disponibilité qui aurait régressé suite à l'application de ce dernier. En effet, les données scientifiques détaillées requises par ce règlement 2377/90 pour la fixation d'une LMR ont imposé un coût élevé à l'industrie, ce qui a entraîné une baisse du nombre de demandes d'autorisations pour de nouveaux médicaments vétérinaires **(Commission européenne, 2015)**.

Dans le domaine de l'apiculture, ce règlement 2377/90 a eu pour conséquence le retrait de plusieurs substances, ce qui a contribué à diminuer l'arsenal thérapeutique disponible pour les abeilles (**FRESNAY, 2013**). Le nouveau règlement 470/2009 permet donc de mieux définir les LMR afin d'augmenter le nombre de médicaments disponibles.

Le **règlement 37/2010** de la Commission du 22 décembre 2009 définit un classement en deux tableaux des substances pharmacologiquement actives qui remplace celui en annexes du règlement abrogé n° 2377/90. Le tableau I contient les substances autorisées : il établit pour chaque substance une LMR définitive (ancienne annexe I du règlement 2377/90) ou provisoire (ancienne annexe III) ou pas de LMR si elle n'est pas nécessaire (ancienne annexe II). Le tableau II liste toutes les substances interdites (ancienne annexe IV) en raison de l'existence d'un risque pour la santé du consommateur.

## **6. RISQUES PRÉSENTES PAR LES RÉSIDUS**

Selon **Scippo (2008)**, les risques présentés par les résidus suite à leur utilisation chez les animaux sont de trois ordres :

- risques pour la santé publique,
- risques pour la santé animale,
- risques pour l'environnement.

### **6.1. RISQUES POUR LA SANTÉ PUBLIQUE**

Ils dépendent de deux facteurs :

- de la transformation in vivo de la molécule d'origine, conduisant à la formation d'un métabolite ayant perdu ses propriétés antibactériennes, mais possédant un pouvoir allergène résiduel. La toxicité de ce résidu peut être augmentée ou diminuée par rapport à celle de la molécule d'origine.
- De la toxico disponibilité qui correspond à la forme sous laquelle le résidu se trouve dans l'organisme. Il peut être libre ou lié à des molécules. Il est alors plus ou moins accessible à la réponse immune de l'organisme, plus ou moins prédisposé à

s'accumuler au niveau de certains organes ou bien à être éliminé. **(CHATAIGNER et STEVENS, 2005)**

Les effets des résidus sur l'organisme sont les suivants :

- Toxicité directe
- Réactions allergiques
- Acquisition de résistances aux antibiotiques
- Perturbation de la flore digestive
- Autres effets dus à la présence de résidus

### **6.1.1. TOXICITÉ DIRECTE**

**La toxicité des résidus des médicaments vétérinaires est liée à :**

- La nature
- La concentration
- La biodisponibilité

#### *6.1.1.1. Nature*

L'antibiotique ne crée pas la résistance, il sélectionne les bactéries résistantes inéluctablement présentes dans tous les écosystèmes bactériens (mutation spontanée). **(BEN YOUSSEF, 2013)**

#### *6.1.1.2. Concentration*

Dans l'Union Européenne, le règlement **2377/1990/CEE**, « il est nécessaire d'établir des limites maximales de résidus (LMR) des substances pharmacologiquement actives utilisées dans les médicaments vétérinaires pour toutes les denrées alimentaires d'origine animale, y compris le miel ».

« Les limites maximales des résidus sont les concentrations en résidus à ne pas dépasser dans un aliment d'origine animale ou végétale pour éviter tout risque pour le consommateur de fait de la présence de ces résidus. »

La notion de LMR = égale synthèse entre les attentes du consommateur et les contraintes des producteurs permettant sans interdire l'utilisation des médicaments leur prescription en toute sécurité. **(BRUNEAU, 2006)**

#### 6.1.1.2. Biodisponibilités

La biodisponibilité varie en fonction de la forme chimique :

- Résidus non extractibles=liés aux macromolécules alimentaires
- Résidus extractibles = (biodisponibilités variables)

Seule la fraction bio disponible des résidus est absorbée par la voie digestive : peu ou pas d'action au niveau digestive.

Fraction non résorbée : action sur la microflore digestive. **(BEN YOUSSEF, 2013)**

Les antibiotiques dont l'utilisation est actuellement interdite et qui présentent plus de toxicité sont le chloramphénicol et nitrofurannes (interdits actuellement). Les nitrofurannes sont soupçonnés de foetotoxicité. Certains sulfamides sont foetotoxiques à forte dose. Ces molécules passent dans le lait maternel, et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un mois. Ils ont des Effets néfastes sur le matériel génétique et notamment l'ADN, sur la reproduction, la fertilité, et une toxicité pour le système nerveux, et le système immunitaire **(CHATAIGNER et STEVENS, 2005)**

Les risques toxiques résultent de l'absorption répétée de résidus dans les aliments et de leur accumulation dans l'organisme humain. Une action pathogène de l'antibiotique (ATB) lui-même ou d'un de ces métabolites sur des structures cellulaires bien précise. D'une façon générale les risques toxiques dépendent de :

- de dose ingérée et la nature de l'ATB.
- Leur absorption au niveau de tube digestif et leur résistance aux principaux procédés de conservation des aliments.

Voici quelques risques toxiques selon les antibiotiques :

**a) Aminosides (streptomycine)**

Sont difficilement absorbés par la voie digestive et ils n'apparaissent que sous forme de résidus dans les tissus animaux lorsqu'ils sont administrés en peros. Les troubles cliniques sont :

- La néphrotoxicité : due à l'accumulation de l'aminoside dans le cortex rénal, au niveau des cellules de l'épithélium du tubule proximal provoquant une nécrose tubulaire sans atteinte de la membrane basale. Les signes révélateurs sont insidieux.

- La neurotoxicité : atteinte cochléo-vestibulaire : l'ototoxicité est dominée par celle des aminosides. L'atteinte est irréversible, le risque en est accru en cas d'insuffisance rénale. **(PILLY. E, 2003)**

**b) Chloramphénicol**

Rapidement absorbés par l'organisme et peut entraîner chez l'homme les lésions suivantes :

-néphrite, une anémie aplasique.

-hémato toxicité

2 types d'accidents sont décrits :

- l'érythroblastopénie : dû à un défaut d'incorporation du fer dans l'hème. La chute des hématies s'accompagne parfois d'une atteinte des autres lignées.
- L'aplasie médullaire : beaucoup plus rare, et mortelle. **(PILLY. E, 2003)**

**c) Tétracyclines**

Sont plus dangereuses surtout pour le fœtus et le nourrisson, car, après leur absorption digestive, elles se fixent dans le tissu osseux et le système nerveux.

Les principaux risques sont :

- des troubles gastro-intestinaux, nausées, vomissements, diarrhées, par suite d'un effet irritatif de la drogue, mais surtout par modification des flores du tube digestif.
- Une coloration jaune des dents chez l'enfant. Les tétracyclines se déposent dans les dents durant les premiers stades de calcification.
- Une atteinte hépatique, associée à l'insuffisance rénale : mortelle.

- Des accidents rénaux : de type *syndrome de fanconi*, une élévation de l'urée sanguine avec acidose. **(DUVAL. J et SOUSSY. CJ, 1990)**

#### **d) Sulfamides**

En raison de la faible solubilité des sulfamides et de leurs dérivés acétylés, les accidents rénaux peuvent apparaître : blocage rénal par précipitation dans les tubules de cristaux. L'hématurie est le premier symptôme.

Les accidents sanguins sont courants : une leucopénie est l'incident le plus fréquent, elle peut aboutir à une agranulocytose, en générale régressive. Une anémie hémolytique. Des troubles hépatiques se manifestent également. **(DUVAL. J et SOUSSY. CJ, 1990)**

### **6.1.2. RÉACTIONS ALLERGIQUES**

On note des réactions allergiques chez des personnes déjà sensibilisées : risques très faibles si les LMR sont respectées.

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particulier des bêta-lactames. Quant aux macrolides, ils causent peu d'effets secondaires et seulement très peu d'entre eux semblent causés par des mécanismes allergiques. Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotiques administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu. **(MAGHUIN. M, 2002)**

D'autant plus que lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale, ils subissent des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène. Les résidus de pénicilline en particulier forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes. Ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessibles aux anticorps. Il est donc peu probable que des dérivés significativement immunogènes puissent être formés. Des techniques très spécifiques et sensibles sont alors nécessaires pour les mettre en évidence. **(MAGHUIN-ROGISTER G, 2005) ; (MAGHUIN M, 2002)**

Cependant, des cas d'allergies aux résidus de pénicilline dans les aliments d'origine animale ont été scientifiquement prouvés, mais ceux-ci restent extrêmement rares, même si les résidus de bêta lactame restent souvent incriminés dans les cas d'allergies alimentaires. **(CHATAIGNER et STEVENS, 2005)**

Les manifestations cliniques peuvent être cutanées : érythèmes divers, érythèmes noueux, polymorphes, urticaire, eczéma de contact, ceci concerne particulièrement la streptomycine.

Le choc anaphylactique, bronchospasme, œdème de Quincke, hyper éosinophilie néphropathies immunes allergiques exceptionnelles.

Les manifestations cliniques peuvent être également hématologiques : anémie hémolytique auto-immune dont les résidus en cause sont les pénicillines et sulfamides, ces derniers sont responsables du purpura thrombopénique. **(PILLY. E, 2003)**

### **6.1.3. ACQUISITION DE RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES**

Toute utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire ou en médecine humaine accroît les risques d'apparition de bactéries résistantes. Les risques les plus grands sont associés à certaines pratiques d'administration des antibiotiques, comme celles qui consistent à administrer simultanément le produit à tout un troupeau, à administrer le produit de façon prolongée ou de sur utiliser un même antimicrobien. Aucun lien direct n'a été établi entre l'usage d'antibiotiques comme stimulateurs de croissance dans les élevages et les antibiorésistances apparues chez les humains. Des chercheurs étudient cependant la possibilité qu'un tel lien puisse exister. **(JEANTET .R ET AL, 2007) ; (SCHWARZ, S. AND E. CHASLUS-DANCLA, 2001) ; (HOLMBERG .S D, 1987)**

À terme, les conséquences sont le manque de moyens efficaces pour traiter certaines infections animales et humaines, en l'absence de nouveaux antibiotiques.

Par exemple, en Afrique du Nord, en 2010 sont apparus sur des bactéries *Salmonella kentucky* déjà résistantes à la ciprofloxacine, d'autres résistances à d'autres antibiotiques comme les

céphalosporines de troisième génération, et les carbapénèmes dont l'usage n'est pourtant pas autorisé en médecine vétérinaire. Ces antibiotiques sont dans certains cas les seules substances restantes qui demeurent efficaces contre les salmonelles. Bien qu'encore rarement isolées, ces souches de *Salmonella kentucky* multirésistantes présentent une impasse thérapeutique pour certaines infections alimentaires en l'absence de nouveaux antibiotiques en développement. **(ANONYME 1a, 2012)**

#### **6.1.4. PERTURBATION DE LA FLORE DIGESTIVE**

Certaines espèces animales apparaissent très sensibles à certains antibiotiques qui peuvent s'avérer particulièrement dangereux, voire mortels et constituer une contre-indication absolue à leur emploi. L'origine en est souvent la perturbation importante de la flore digestive. C'est le cas particulièrement :

- des pénicillines du groupe A par voie orale chez le lapin, le lièvre, le cobaye et le hamster
- des tétracyclines ou des Lincosamides chez les chevaux **(BOUCHARD. E, 2004)**

Des études in vivo sur des modèles animaux visant à évaluer les effets de doses thérapeutiques et de résidus de tétracycline sur la flore intestinale humaine ont mis en évidence les modifications engendrées sur la flore intestinale. Il y a effectivement eu une sélection de bactéries résistantes à la tétracycline, ainsi qu'un effet sur les populations fécales aérobies et anaérobies, sans compter les modifications de certains paramètres métaboliques de la microflore. Par contre, la barrière contre les salmonelles exogènes a été maintenue. **(CHATAIGNER et STEVENS, 2005)**

#### **6.1.5. Risques pour l'environnement**

Il est aujourd'hui admis qu'après un traitement antibiotique, les animaux excrètent dans leur environnement une fraction de la dose administrée : elle est présente notamment dans les fumiers ou les lisiers, ainsi que dans les poussières en suspension avant d'être dégradée plus ou moins rapidement dans les fosses de rétention. En effet, on constate de fortes disparités dans le temps de demi-vie selon la molécule : la tylosine, par exemple, est dégradée beaucoup plus

rapidement que l'oxytétracycline, détectable dans le fumier de veaux traités pendant 5 mois contre moins de 45 jours pour la tylosine. Ceci implique une persistance longue de certains antibiotiques dans l'environnement, ces derniers pouvant alors être présents dans les eaux de surface ou les rivières. Ceci conduit donc à une pollution chimique de l'environnement, avec une action sur la flore microbienne pouvant être la même que sur la flore commensale, d'autant plus que les antibiotiques excrétés le sont à des doses très inférieures à la Concentration Minimale Inhibitrice. **(CHATELLET, 2007) ; (DEVIE P et al 2006)**

L'administration d'antibiotiques, par la sélection de mutants résistants dans la flore intestinale des animaux traités, peut avoir des conséquences indirectes sur l'environnement : par la défécation, les animaux excrètent certains de ces mutants, qui peuvent alors, par les mécanismes génétiques de transfert de résistance déjà évoqués plus haut, transmettre leurs mécanismes d'échappement aux bactéries environnementales. Ces mutants peuvent accidentellement contaminer les denrées alimentaires : c'est ainsi qu'après l'utilisation, entre 1983 et 1990, de la streptothricine en ex-Allemagne de l'Est pour l'alimentation animale, les premières souches résistantes d'*E. coli* sont apparues deux ans plus tard, ont transmis leur gène de résistance par l'intermédiaire d'un transposon, aboutissant à l'émergence de mutants résistants à l'antibiotique chez les porcs, mais aussi chez les éleveurs et les membres de leur famille. Des souches résistantes d'*E. coli* sont fréquemment retrouvées lors de l'analyse des eaux usées, et il est prouvé que ces dernières peuvent très bien y survivre, et échanger entre elles des plasmides porteurs de gènes de résistance. Les eaux usées sont utilisées pour irriguer, et des bactéries résistantes ont été retrouvées sur des plantations 15 jours après qu'elles eurent été arrosées. De plus, un animal peut se contaminer en s'abreuvant aux eaux de surface. De la même façon, des bactéries d'origine fécale sont épandues avec le fumier, et par conjugaison peuvent transmettre leurs éventuels gènes de résistance aux bactéries du sol. L'utilisation des antibiotiques en élevage représente donc un risque de sélection de résistance chez les bactéries environnementales. **(CHATELLET, 2007) ; (DEVIE. P et al 2005)**

# QUATRIÈME CHAPITRE : MÉTHODES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

## 1. HISTORIQUE ET EVOLUTION DES MÉTHODES DE DÉTECTION

L'utilisation des tests de détection des inhibiteurs est très ancienne, les premiers tests ont été utilisés quelques années après l'apparition des antibiotiques (**BROUILLET, 2002**).

Dès 1952, le premier test de détection des inhibiteurs dans le lait était mis au point. Il était fondé sur l'inhibition du développement de différentes souches de bactéries (**FABRE *et al*, 2002**), selon ce dernier, deux voies de recherche ont été explorées :

- Les recherches microbiologiques ont été améliorées en sélectionnant des souches et en modifiant les milieux de culture pour augmenter la sensibilité à certains antibiotiques et élargir le spectre,
- De nouvelles méthodes (immuno-enzymatique) ont été mises au point pour diminuer le temps d'analyse.

## 2. DÉTECTION DES RÉSIDUS ANTIBIOTIQUES

### 2.1. IMPORTANCE ET NÉCESSITÉ

La détection des résidus d'antibiotiques est d'une importance majeure sur plusieurs niveaux :

- Sur le plan médical : les résidus d'antibiotiques présentent maints risques pour la santé à savoir les allergies, la toxicité, la résistance bactérienne.

Leur détection sera d'un grand apport pour l'homme, une clé de sa sécurité sanitaire. (**ADEL REZGUI, 2009**).

- Sur le plan économique : Actuellement, avec le développement de l'économie de marché, une libéralisation de la profession vétérinaire est observée. Cependant, aucun contrôle n'est exercé sur le circuit de distribution des produits pharmaceutiques vétérinaires et phytosanitaires.

Dans la plupart des pays africains. Pire, jusqu'à ce jour aucune législation appropriée n'existe pour garantir la qualité des divers produits livrés sur le marché africain (**MESSOMO NDJANA. F, 2006**).

Le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale s'effectue en deux étapes avec la recherche d'un effet antibiotique par une méthode de dépistage (microbiologique, immunologique ou physico-chimique) et la confirmation de la présence de l'antibiotique par une méthode physico-chimique (chromatographie liquide couplée à la détection UV, fluorimétrie ou la spectrométrie de masse). (**GUILLEMOT, 2006**)

## **2.2 TESTS DE DÉPISTAGE**

Le dépistage est effectué au moyen d'une méthode d'analyse donnant une indication forte de la présence d'un résidu dans un échantillon. (**MAGHUIN-ROGISTER, 2005**)

Les tests de dépistage ont pour objectifs de détecter un maximum de substances différentes à un seuil proche ou inférieur à la limite maximale des résidus. Ils doivent aussi permettre de faire rapidement des analyses sur un grand nombre d'échantillons, afin de ne retenir qu'un faible nombre suspect à soumettre à une méthode de confirmation.

Pour le dépistage, les tests microbiologiques présentent l'intérêt d'avoir un spectre large, néanmoins ils présentent des inconvénients tels que le manque de sensibilité à certains antibiotiques et l'éventuelle sensibilité à des inhibiteurs naturels (**FABRE et al, 2002**).

Les méthodes de dépistage et de détection 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 conforme doivent être confirmés à l'aide de méthodes de confirmation.

Les principales exigences des méthodes de dépistage sont :

- La méthode employée doit être capable de détecter le résidu en dessous de sa LMR dans le cas où ce résidu en a une.
- 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 (CC $\beta$ ) 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.

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. M, TOLDRA. F, 2008)

### **2.2.1. Delvotest®**

C'est un test biologique simple, très utilisé, standardisé, fondé sur la multiplication d'un germe : *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*. (ZINEDINE *et al*, 2007) ; (REYBROECK, 2004) ; (BROUILLET, 2002) ; (FABRE *et al*, 2000) ; (ROMNEE *et al*, 1999) ; (BROUILLET, 1994) ; (BILLON, 1981)

Bien que le test détecte certains antibiotiques qu'on trouve dans le lait, comme, la pénicilline G, la cloxacilline, la sulfaméthazine, la sulfadiazine, la céphalexine, la gentamicine, il est moins sensible pour d'autres comme la tétracycline et l'oxytétracycline. (LE BRETON *et al*, 2007)

Le test se présente sous la forme d'ampoules contenant un milieu gélosé ensemencé par le germe test (spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), avec un indicateur coloré de pH, du triméthoprime et des comprimés de milieu nutritif à incorporer dans les ampoules au moment de leur utilisation. **(ROMNEE, 2009) ; (REYBROECK, 2004) ; (ABIDI, 2004) ; (BROUILLET, 2002)**

Un échantillon de 0,1 ml de lait est laissé à diffuser dans le milieu gélosé, l'ampoule est fermée par un ruban adhésif et placé pendant 2 h 30 à 3 h dans un incubateur à  $64 \pm 1^\circ\text{C}$ . Si le lait ne contient aucune substance inhibitrice, l'indicateur de pH vire du violet au jaune en raison de la production d'acide par le germe. Mais en présence de substances inhibitrices, la couleur du milieu gélosé reste pourpre (violet), car ces dernières empêchent la croissance du germe et par conséquent la production d'acide lactique. **(ROMNEE, 2009) ; (SCIPPO et MAGHUIN-ROGISTER, 2006) ; (ABIDI, 2004) ; (REYBROECK, 2004) ; (BROUILLET, 2000) ; (MORETAIN, 2000) ; (ARCHIMBAULT *et al*, 1978)**

### **2.2.2. CHARM TEST**

Il permet la détection de nombreux antibiotiques (pénicilline, tétracycline, macrolides, sulfamides, aminoglycosides) par une réaction d'immunocompétition entre la molécule à rechercher et une molécule marquée au C14 ou H3.

C'est un test de compétition mesuré par radioactivité (propriétés de scintillement du lait contaminé) qui permet une identification précise et un dosage, qui peut être calé sur les seuils des limites maximales des résidus.

Il nécessite un investissement important, mais permet d'identifier l'inhibiteur présent **(AUDIGIE. CL, 1995)**

#### **2.2.2.1. Principe**

Le principe est simple, on met en contact une culture de bactéries (récepteur) avec un antibiotique marqué qui se fixe sur le site spécifique des bactéries. Si le même antibiotique est présent dans le lait à tester il y'a compétition et une partie des molécules marquées ne se fixe pas. Après centrifugation et filtration, on effectue le dosage avec un compteur de particule, par

comparaison avec un témoin négatif (KORSRUD G.O. *et al*, 1998) ce qui est illustré par la figure ci-dessous.

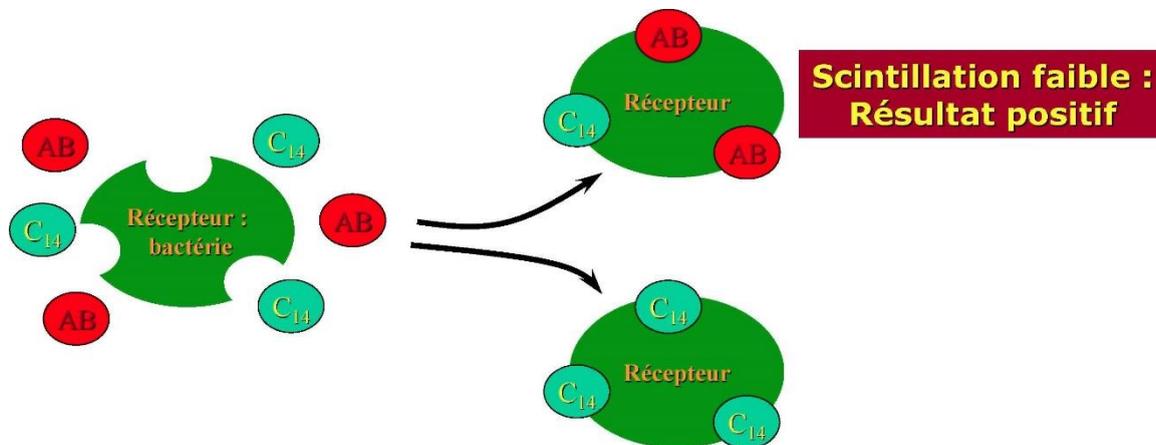


Figure N° 1: principe de Charm test II

### 2.3.3. Premi®test

Développé par DSM, le Premitest permet de détecter les résidus d'antibiotiques présents dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, le poisson et les œufs.

C'est un test à large spectre, il détecte un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande. Au bout de 4 heures, il donne un résultat fiable (ELOIT, 2004).

#### 2.3.3.1. Description

Le Premi®Test permet de détecter les substances antimicrobiennes présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, le poisson et les œufs. C'est un test à large spectre, qui permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande en moins de 4 heures, sur du jus de viande (extrait par pressage d'un morceau de viande). (BEVERLEY. S, SHARMAN. M, 2001)

#### 2.3.3.2. Principe du Premi®test

C'est un test de détection mis au point pour la détection des résidus d'antibiotiques, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs.

L'échantillon est laissé à diffuser dans une ampoule contenant du milieu gélosé ensemencé par des spores de *Bacillus stearothermophilus* avec un indicateur de pH.

Après incubation, la croissance normale des micro-organismes provoque l'acidification du milieu ce qui change la couleur de l'indicateur de pH du violet vers le jaune. En présence de substances inhibitrices (résidus d'antibiotiques), si la couleur du milieu reste violette après incubation, l'échantillon est rapporté comme échantillon positif, et si la couleur du milieu vire au jaune l'échantillon est considéré comme échantillon négatif. (**SCIPPO. M. L., MAGHUIN-Registrier G, 2006**)

#### 2.3.3.3. Mode opératoire

Le Premitest est d'une utilisation simple. Le jus de viande est déposé dans des tubes à essai contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacillus stearothermophilus*. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus et préchauffage de l'incubateur pendant 20 minutes, il faut incuber le tube pendant environ 3 heures à 64°C et vérifier la couleur. (**ANONYME14, 2006**) ; (REYBROEK. W, 2000)

La lecture du résultat se limite à une comparaison de couleurs. En l'absence d'antibiotiques, les spores germent et se développent, entraînant l'acidification du milieu et un changement de couleur. Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que la quantité de composés antimicrobiens se situe en deçà des limites de détection du Premi®test. Inversement, en présence d'antibiotiques, les spores ne se développent pas, elles sont inhibées par l'antibiotique ; une couleur violette indique un taux d'antibiotiques supérieur ou égal à la limite de détection du test. (**ANONYME14, 2006**) ; (REYBROEK. W, 2000)

#### 2.3.3.4. Interprétation des résultats

La lecture du résultat « oui/non » se limite à une comparaison de couleurs. En l'absence d'antibiotiques, les spores germent et se développent, entraînant l'acidification du milieu et un changement de couleur. Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que la quantité de composés antimicrobiens se situe en deçà des limites de détection du Premi® Test. Inversement, en présence d'antibiotiques, les spores ne se développent pas, elles sont inhibées par l'antibiotique : une couleur violette indique un taux d'antibiotiques supérieur ou égal à la limite de détection du test. (**ARTS. C et al, 2000**)

## 2.4. MÉTHODES DE CONFIRMATION

Les méthodes de confirmation sont aujourd'hui des méthodes physico-chimiques en premier lieu et secondairement des méthodes immuno-enzymatiques, 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). C'est la technique de choix pour identifier et doser le chloramphénicol par exemple.
- L'HPLC-SM avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI en anglais).
- ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (DELEPINE *et al*, 2002)

### 2.4.1. Méthode immuno-enzymatique « ELISA »

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique rapide (de quelques minutes à 20 minutes), mais onéreuse. Elle est spécifique pour une famille d'antibiotiques et sensible pour cette dernière. Sa limite de détection est souvent inférieure à la limite maximale des résidus (ABIDI, 2004 ; VERHNES, 2002)

#### 2.4.1.1. Historique

À la fin des années 60, **Stratis-Avrameas** et **Pierce** mettent au point la technique d'immunoenzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps et utilisant comme marqueur des enzymes (HANZEN, 2008). La technique d'ELISA a été ensuite conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois, **Perlmann** et **Engvall** à l'Université de Stockholm en 1971.

#### 2.4.1.2. Principe de la méthode

L'ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. (HANZEN, 2008)

La méthode est dite directe lorsque, en une étape, on utilise uniquement un anticorps conjugué qui est soumis à incubation avec l'antigène contenu dans l'échantillon.

La méthode indirecte en deux étapes utilise un anticorps secondaire conjugué pour la détection. En premier lieu, l'anticorps primaire est incubé avec l'antigène contenu dans l'échantillon. Cette opération est suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire conjugué qui reconnaît l'anticorps primaire (**ANONYME 1a, 2012**)

#### 2.4.1.3. Variantes de la technique ELISA

Les tests ELISA peuvent se réaliser selon deux méthodes :

- Elles sont dites de type "sandwich" quand la couleur développée est proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon,
- Et sont dite de type "compétition" directe ou indirecte lorsque la couleur développée est inversement proportionnelle à la quantité présente.

##### 2.4.1.3.1. *Protocole général de la méthode ELISA type sandwich*

Dans les ELISA de type « sandwich », l'analyte recherché est capturé par un premier anticorps et détecté grâce à un deuxième anticorps. Ce dernier est marqué au moyen d'un enzyme ; l'analyte est véritablement pris en sandwich entre les deux anticorps (figure n° 3). La réponse est dans ce cas directement proportionnelle à la concentration en analyte dans l'échantillon (**SCIPPO, 2006 ; ANONYME1a, 2012**).

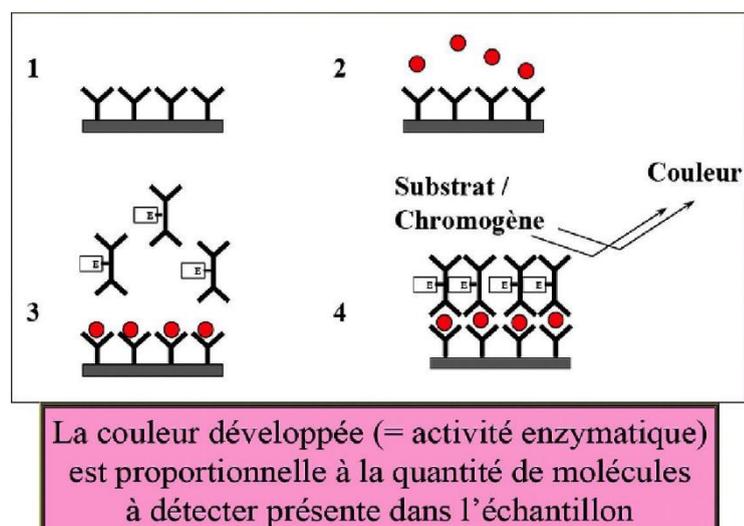


Figure N° 2 : ELISA type "sandwich" (Espinasse *et al*, 2011).

#### 2.4.1.3.2. Protocole général de la méthode ELISA compétitive

Les ELISA de type « compétition » et par opposition aux ELISA de type « sandwich », l'antigène est marqué par un 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. **(SCIPPO, 2006)**

Le terme compétitif décrit des essais où la mesure implique la quantification d'une substance selon sa capacité à interférer avec un système établi. **(ANONYME1a, 2012) ; (ESPINASSE ET AL, 2011)** Le principe de la méthode repose sur l'ensemble des étapes suivantes :

- 1) Les plaques à utiliser sont sensibilisées au préalable (adsorption d'une quantité connue de l'antigène voulu sur le fond des puits).
  - 2) Bloquer ensuite tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface (saturation).
  - 3) Appliquer l'échantillon ou les étalons.
  - 4) Les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène sur une microplaque. Les antigènes immobilisés à la surface et les antigènes en solution entrent en compétition avec les anticorps. Ainsi, plus il y aura d'antigène dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'antigène immobilisé.
  - 5) Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés) et les complexes anticorps-antigènes non liés.
  - 6) Ajouter un chromogène qui sera converti par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique,
  - 7) enfin, mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène.
- Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et conjuguées **(ANONYME1a, 2012) ; (ESPINASSE et al, 2011)**.

Pour la méthode indirecte, en plus des étapes précédentes, elle nécessite l'ajout d'un anticorps secondaire, spécifique à l'anticorps primaire, et conjugué avec une enzyme.

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elles doit

être conjuguée.

Pour ce type de réaction, plus la concentration initiale d'antigène est élevée, plus le signal éventuel est faible (**ANONYME1a, 2012 ;**) (**ESPINASSE et al, 2011**).

#### 2. 4.1.3.3. *Calculs des résultats*

##### **a) Tests semi-quantitatifs**

Le résultat est obtenu en comparant la couleur de l'essai à celle d'un témoin de concentration connue. Cette appréciation est visuelle, et se fait sur un fond blanc. Si l'essai est plus coloré que le témoin, il contient moins de concentration que la valeur indicative du témoin. Pour plus de sûreté, l'appréciation peut se faire à l'aide d'un lecteur de microplaques (**ESPINASSE et al, 2011**).

##### **b) Tests quantitatifs**

Le principe général consiste à établir une courbe d'étalon avec des solutions contenant des concentrations connues d'Ag. Une série de dilutions successives est fournie dans le kit afin d'obtenir des concentrations finales différentes. Différents modes de représentation peuvent être utilisés pour les courbes d'étalonnage. Pour permettre de calculer plus facilement une concentration, les données sont d'abord transformées de manière à exprimer l'intensité du signal sur une échelle de 0 à 100, la valeur de la densité optique (DO) du point 0 ppm ou ppb (selon le test) correspondant à 100 et les autres valeurs de DO sont exprimées en % de cette valeur (B/Bo %) (**ESPINASSE et al, 2011**).

### **2.4.2. Méthodes physico-chimiques**

Les années 80 ont été marquées par le développement de nouvelles méthodes de dépistage, comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (**SAMANIDOU et al, 2007 ; FRITZ et al, 2007**), la chromatographie sur couche mince (TLC) (**ZVIRDAUSKIENE et al, 2007 ; PENA et al, 2007**) 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.

#### 2.4.2.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Une analyse HPLC permet la séparation de composés en solution élués à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide, elle-même percolée grâce à une pression élevée. 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. **(BURGOT et BURGOT, 2006 ; MARCOZ, 2003)**

Cette méthode permet de séparer des composés de masse molaire variables et de nature chimique différente. La HPLC est devenue la première technique analytique présente dans les laboratoires de recherche et d'analyses. Elle couvre tous les domaines d'applications **(SAUNIER et GODIN, 2013)**.

#### *2.4.2.1.1. Principe*

La phase mobile parcourt un tube appelé colonne, cette colonne peut contenir des granulés poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire.

Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne, ce mélange doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charge. **(CUQ, 2007) ; (ANONYME3a, 2007)**

Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement est différente. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Chaque soluté est alors soumis à une force de rétention, exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité, due à la phase mobile. **(CLARK. J, 2009) ; (PANAIVA, 2006)**

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé

ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Le principe est donc d'exploiter les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer ces solutés en fonction de leurs affinités et ainsi de les identifier et/ou de les doser. (CLARK. J, 2009) ; (PANAIVA, 2006).

La chromatographie liquide haute performance classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté, phase mobile et phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence (MARCOZ, 2003).

#### 2.4.2.1.2. Instrumentation

Selon les auteurs suivants : Saunier et Godin, (2013), dans tous les appareils de chromatographie liquide haute performance, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre illustrés sur le schéma ci-dessous.

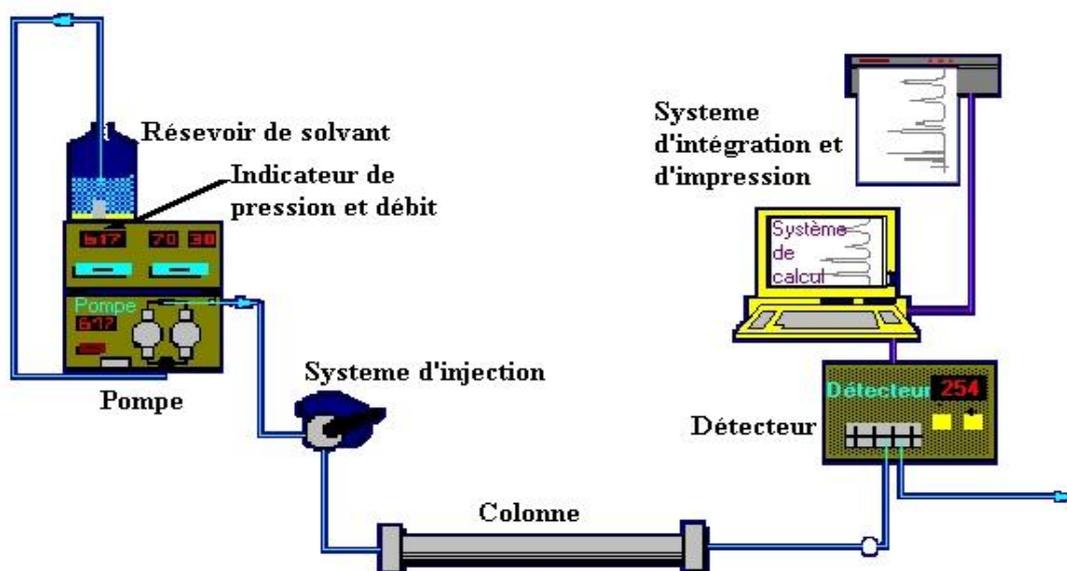


Schéma N° 3 : instrumentation de l'HPLC (Anonyme, 2007).

### **a) Réservoirs des solvants**

Ils contiennent la phase mobile en quantité suffisante, plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide des pompes. **(SALGHI, R, 2004) ; (ANONYME3b, 2007)**

### **b) Pompes**

Les pompes utilisées en HPLC permettent de délivrer les solvants à débit constant sous de fortes pressions pouvant atteindre quelques centaines de bars, dont le but est de forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne. Son rôle est double :

D'abord, elles permettent le maintien d'un débit constant, quelles que soient la pression et la variation de composition de la phase mobile, mais aussi d'obtenir un débit suffisant jusqu'à 10 ml/min sans perte d'exactitude et de reproductibilité. **(SAUNIER et GODIN, 2013)**

Les pompes sont munies d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elles permettent donc de travailler en mode isocratique (avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse) ou en mode gradient (une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants). Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques  $\mu\text{l}$  à plusieurs ml/min. **(THIERRY, B .2009) ; (ANONYME3c, 2007)**

**Remarque** : L'élution à gradient est plus chère que l'élution isocratique ce qui est préféré des simples échantillons contenant moins 10 composants **(SCHELLINGER ET AL, 2006)**

### **c) vanne d'injection**

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes : 10, 20, 50  $\mu\text{l}$ . Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, sans variation importante de la pression, dans le circuit

allant des pompes vers l'entrée de la colonne ; ce qui est important pour l'analyse quantitative. **(THIERRY, B, 2009) ; (LEBIHAN et LEMASSON, 2008)**

#### **d) Colonne**

C'est un tube qui doit être en inox ou en verre (inerte aux produits chimiques). Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Il renferme la phase stationnaire qui peut être polaire (phase normale) ou non polaire (phase inverse). **(THIERRY, B .2009) ; (LEBIHAN et LEMASSON, 2008)**

Les supports de la colonne sont des solides très finement divisés dont la principale propriété est d'être inerte vis-à-vis des phases stationnaires et mobiles. Le support majoritairement utilisé est le gel de silice formé de grains de diamètre variant de 1,5 à quelques dizaines de micromètres. Ces grains présentent à leur surface des pores de diamètres différents (80 à 300  $\mu\text{m}$ ) à travers desquels la phase mobile circule. **(SAUNIER et GODIN, 2013)**

- La phase normale : elle est constituée de gel de silice ; ce matériau est très polaire, il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. **(PREMA, 2003)**

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations. **(THIERRY, B .2009)**

- La phase inverse : elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones ( $\text{C}_8$  et  $\text{C}_{18}$ ). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (acétonitrile, méthanol, eau). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours

du temps et la qualité de la séparation est donc maintenue constante. **(JACOB. V, 2010) ; (FEKETE et al, 2009) ; (THIERRY, B .2009)**

La technique d'HPLC en phase inverse est souvent choisie comme choix initial. Elle est de plus en plus considérée comme la meilleure technique de séparation pour atteindre la haute résolution, un temps court et une meilleure reproductibilité des temps de rétention en manipulant les conditions de HPLC **(WANG. et al, 2003) ; (MAJORS. et al, 2002)**

Généralement, il existe de nombreux facteurs qui influent sur la séparation de la colonne et de l'efficacité, notamment la température, la taille des particules, la longueur et le débit de la phase mobile **(WANG et al, 2003) ; (SNYDER. et al, 1988)**

#### **e) Détecteurs**

Placé en sortie de colonne, le détecteur enregistre un signal (électrique ou optique) en fonction du temps caractéristique du passage progressif des solutés.

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

- Le détecteur UV-visible : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci étant fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'onde variant de 190 à 350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm **(JACOB. V, 2010) ; (THIERRY, B .2009) ; (LEBIHAN et LEMASSON, 2008) ; (ANONYME3c, 2007).**

Selon **Saunier et Godin, (2013)**, pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand,
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

- **Le réfractomètre** : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice.

Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur. Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur, soit d'une station d'acquisition (**JACOB. V, 2010**) ; (**THIERRY, B .2009**) ; (**LEBIHAN et LEMASSON, 2008**) ; (**ANONYME3b, 2007**).

#### 2.4.2.1.2. Analyses des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits, la figure n° 5 montre la différence entre un bon et un mauvais chromatogramme.

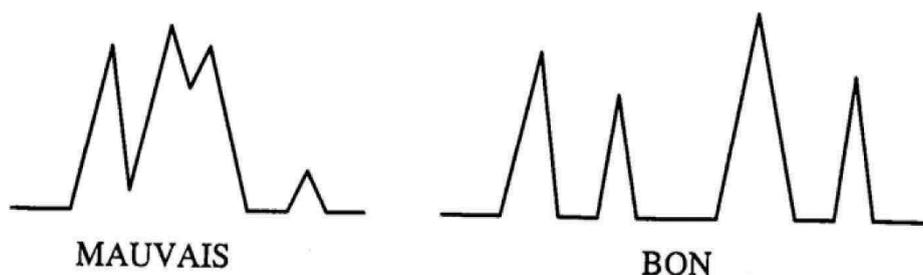


Figure N° 4 : L'analyse qualitative d'un chromatogramme (Anonyme. a, 2006).

Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible, pour cela, il faut préciser pour chaque analyse le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support..., la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, son débit, le mode de détection  $\lambda$  en nm, la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme et la sensibilité du détecteur.

#### 2.4.2.1.3. Analyse qualitative

##### a) temps de rétention

Le temps de rétention ( $t_{R}$  en min) est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées ainsi l'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire (normale ou à polarité inversée) se répercute sur les temps de rétention des solutés.

Le temps de rétention ( $t_R$ ) = temps écoulé entre l'injection et le point maximal du pic.

Le temps mort ( $t_M$ ) = temps écoulé pour qu'un constituant non retenu traverse la colonne **(ANONYME 4, 2006)**.

Le temps de rétention est habituellement utilisé à la place du volume de rétention et sa grandeur dépend de la nature de la phase stationnaire, de la nature de la phase mobile, du débit de la phase mobile, et enfin de la longueur de la colonne **(ANONYME3b, 2007)**.

#### 2.4.2.1.4. Analyse quantitative

La chromatographie est une technique analytique quantitative, basée sur une relation entre la quantité massique du soluté injecté et l'aire du pic du chromatogramme donné par le détecteur, c'est à dire que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé. **(Anonyme. à, 2006)**

La masse  $m_i$  du soluté  $i$  détectée est proportionnelle à l'aire  $A_i$  du signal mesuré par le détecteur :

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

$K_i$  est le coefficient de réponse du détecteur pour le soluté  $i$ , il dépend de la colonne utilisée, de la sensibilité du détecteur vis-à-vis du soluté  $i$  et des conditions expérimentales.

$A_i$  est l'aire du pic d'élution du soluté  $i$  sur le chromatogramme. Cette aire de pic est déterminée automatiquement grâce à un enregistreur-intégrateur.

Dans la pratique, il faut donc déterminer  $K_i$  et  $A_i$  pour un soluté  $i$  donné dans les conditions d'analyses données **(ANONYME 4, 2006)**.

#### 2.4.2.1.5. Avantages de la chromatographie liquide haute performance

La chromatographie en phase liquide présente les avantages suivants :

- elle est utilisée pour des solutés de masse moléculaire élevée, peu volatils, sensibles aux températures élevées. Ces solutés peuvent être non polaires, polaires ou ioniques.
- Elle analyse de très petites quantités, présente une extrême sensibilité, possède un grand pouvoir de séparation et une excellente reproductibilité **(JACOB. V, 2010) ; (THIERRY, B .2009) ; (ANONYME3a, 2007)**

#### 2.4.2.1.6. Domaines d'application de l'HPLC

Les domaines d'application de l'HPLC sont extrêmement nombreux et vastes, mais elle est particulièrement employée en cosmétologie ou en biochimie. Elle permet l'analyse soit de substances thermiquement instables, puisque l'opération s'effectue à température ambiante, de substances peu volatiles de masse moléculaire pouvant atteindre **2 000 000**, soit encore de substances ionisées. C'est ainsi une méthode « douce » avec les molécules. Les molécules d'intérêt biologique comme les vitamines, les sucres et les acides aminés peuvent être analysés directement sans passer par la formation de dérivés, et la séparation de protéines et de polymères synthétiques peut être réalisée, même si leur masse est élevée. **Quelques exemples d'application :**

- Cinétique des réactions chimiques **(OSTROWSKI. T ET AL, 2003)** ou enzymatiques. **(GHASHGHAIE .J ET AL, 2001) ; (CHEVIRON .N, 2000)**
- Calcul du coefficient de partage de séries d'analogues **(GUENARD .D. Et Al, 2000)**
- Etude des caractères phospholipophiles d'une famille de molécules organiques par HPLC **(DUMONTET. B, 2003)**
- Dosage de molécules actives dans des fluides biologiques ou des extraits bruts **(ADELINE. MT ET AL, 1997)**
- Etude analytique d'extraits biologiquement actifs de substances naturelles **(POUPAT. C. Et Al, 2000)**
- Isolement de produits purs à partir de mélanges de produits naturels ou de synthèse **(DUMONTET. V ET AL, 2004)**

L'HPLC est une méthode physico-chimique qui permet la détection et la quantification des résidus d'une gamme assez large des antibiotiques s'étendant à toutes les familles utilisées en médecine humaine et vétérinaire. C'est une méthode nettement plus sélective et plus sensible que les méthodes microbiologiques, car elle permet d'identifier les molécules séparément et donc éviter les problèmes d'interférences possibles entre les substances.

**(BOATTO *et al*, 1998)**

Différentes méthodes d'extraction peuvent être appliquées telles que : l'extraction liquide-liquide, l'ultrafiltration, la précipitation des protéines et l'extraction en phase solide. **(OLIVEIRA *et al*, 2006)**

## **Partie expérimentale**

## 1. Objectifs

Cette étude a comme objectif principal, le développement d'une méthode d'analyse fiable et reproductible des résidus d'antibiotiques dans le miel afin de permettre l'identification et la quantification de ces derniers dans les denrées animales et d'origine animale (DAOA).

La réalisation de cet objectif passe par les étapes suivantes :

- La mise au point d'une méthode dite qualitative de détection des résidus d'antibiotiques dans le miel, cette dernière est basée sur le **Premi®test** ;
- La mise au point d'une méthode quantitative pour l'identification et la quantification des résidus d'antibiotiques dans le miel, la méthode adaptée est une méthode chromatographique : la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) qui nécessite plusieurs phases de réalisations : l'optimisation et la validation de la méthode d'analyse ainsi que l'adaptation d'une méthode d'extraction des analytes ;
- Mise au point d'une méthode d'extraction des résidus d'antibiotiques à partir du miel
- Appliquer les méthodes mises au point à des échantillons de miel local et d'importation ;
- Comparer les résultats obtenus avec les limites maximales des résidus d'antibiotiques dans le miel fixées par les organismes internationaux (comité Européen et la commission du *codex alimentarius*).

## **2. Localisation spatio-temporelle de l'étude**

L'étude est réalisée au niveau de la région de Constantine. C'est une ville du nord-est de l'Algérie. Elle est limitée au nord par la wilaya de Skikda, au sud par la wilaya d'Oum El Bouaghi, à l'est par la wilaya de Guelma et à l'ouest par la wilaya de Mila. Avec une superficie de 2231.63 km<sup>2</sup> et une population de 448 374 habitants depuis le dernier recensement fait en 2008. Le nombre de communes est de 12 appartenant à 6 daïras.

D'autres parts l'étude s'est déroulée sur plusieurs étapes qui se suivent chronologiquement :

- Optimisation des paramètres d'analyse de la méthode choisie (Premi<sup>®</sup>test, HPLC) ;
- Validation de la méthode d'analyse choisie (Premi<sup>®</sup>test, HPLC) ;
- Adaptation d'une méthode d'extraction des résidus d'antibiotiques à partir du miel ;
- Récolte d'échantillons de miels local et importé pour les soumettre à l'analyse ;
- Interprétation des résultats obtenus et comparaison avec les LMR standard pour les résidus d'antibiotiques dans le miel.

# **PREMIÈRE PARTIE : DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE MIEL PAR LA MÉTHODE DE SCREENING PEMITEST**

## **1. INTRODUCTION**

Généralement, les apiculteurs utilisent les antibiotiques pour lutter contre les infections qui touchent l'abeille à cause de leur facilité d'usage et pour leurs résultats spectaculaires. Cette pratique laisse des résidus dans le miel et les produits de la ruche. Afin de protéger le consommateur, des tests rapides pour détecter les résidus d'antibiotiques sont requis. **(CHULEEPORN. S, 2013)**

Pour pallier à ce problème, dans cette première partie, nous allons développer une méthode effective et commercialement applicable de dépistage des résidus de certains antibiotiques les plus fréquemment utilisés en apiculture basée sur l'inhibition microbienne.

Dans la théorie cette méthode qu'est le **Premi®test** comporte des avantages considérables : méthode pas chère, facile d'usage, bien adaptée pour les analyses d'échantillons à grande échelle et permet la détection d'une grande variété des résidus d'antibiotiques dans diverses denrées alimentaires incluant le miel à des seuils égaux ou inférieurs aux LMR fixées par les organismes internationales (EU, *codex Alimentarius*).

Par contre on peut dénombrer certains inconvénients qui n'entrave en aucun cas l'usage de cette méthode qu'est la détection des résidus, mais qu'il faut considérer, comme : le fait que la méthode n'ait pas spécifique (indique seulement la présence ou non des résidus d'antibiotiques) donc elle est dite qualitative en opposition aux méthodes quantitatives (HPLC) qui permettent d'identifier la nature des résidus ainsi que leur concentration dans les denrées alimentaires.

La purification et l'extraction sont les premières étapes de ce protocole ensuite les échantillons de miel subiront une période d'incubation de 3 heures pour effectuer la lecture des résultats qui se base sur un virement de couleur en cas de tests positifs.

## **2. MATERIELS & METHODE**

### **2.1. MATERIELS**

#### **2.1.1. Matériels utilisés pour la méthode de screening (Premi®test)**

##### **2.1.1.1. Équipement**

- Bain-marie (LABTEK, capacité : 20 litres)
- pH mètre (INOLAB 720)
- Balance analytique (KERN. Capacité : 300 g lecture : quatre chiffres après la virgule)

- film de protection perforé et seringue doseuse.

2.1.1.2. Description de produit : **Premi®test** est un test de détection microbiologique à large spectre, spécialement mis au point pour la détection, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs, de la présence de substances antimicrobiennes telle que les résidus des antibiotiques à un niveau égal ou inférieur à la plupart des **LMR** (limite maximale de résidus).

2.1.1.3. Produits chimiques

- Eau déminéralisée
- Hydroxyde de Sodium (NAOH)
- Solutions tampons pour pH mètre

2.1.1.4. Petits matériels

- Macropipette (5 et 10 ml)
- Becher (10,100, 250 et 500ml)
- Papier absorbant

2.1.1.5. Échantillons et méthode d'échantillonnage

Nous avons récolté les échantillons de miel dans le commerce local, la méthode d'échantillonnage adoptée est la méthode à échantillon simple est aléatoire, c'est-à-dire que chaque individu de la population est choisi indépendamment de l'autre et chacun d'entre eux à la même probabilité de faire partie de l'échantillon. De la sorte, nous obtenons des échantillons représentatifs.

Les échantillons prélevés sont acheminés au laboratoire PADESCA sous régime de froid ensuite ils sont enregistrés et stockés dans le réfrigérateur à + 4 C° à l'abri de la lumière et de l'air. Leur répartition est détaillée dans le tableau N°1 :

**Tableau N° 1 : répartition des échantillons**

<b>Type de miel</b>	<b>désignation</b>	<b>nombre</b>	<b>total</b>
<b>MIEL DE PRODUCTION LOCALE</b>	Miel Constantine	14	<b>56</b>
	Miel Alger	15	
	Miel Hamadia (BBA)	04	
	Miel Zéghaia (BBA)	03	
	Miel Mansoura (BBA)	03	
	miel Selaoua Ainouna (Guelma)	03	
	Miel Barhoum (m'sila)	02	
	Miel Jijel (Jijel)	01	
	Miel El Eulma (Sétif)	01	
	Miel Kabouya (M'sila)	01	
	Miel Ain Makhlouf (Guelma)	01	
	Miel Bordj Snoussi (Guelma)	01	
	Miel Bordj Sabat (Guelma)	01	
	Miel Lerbea (Guelma)	01	
	Miel Ras El Ayoun (Laghouat)	01	
	Miel Tedj Moutt (Laghouat)	01	
	Miel Laghouat (Laghouat)	01	
	Miel Aflou (Laghouat)	01	
	Miel Sidi Makhlouf (Guelma)	01	
	Miel Blida (Blida)	01	
Miel Ain ghrab (Guelma)	01		
<b>MIEL D'IMPORTATION</b>	Miel el chiffa	55	<b>57</b>
	Miel lune de miel France	01	
	Miel Ukraine	01	

## 2.2. MÉTHODE

### 2.2.1. Détection des résidus d'antibiotiques par la méthode Premi®test

#### 2.2.1.1. Choix de la méthode

La présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées pose un véritable problème de santé. D'où la nécessité d'instaurer des plans de surveillance et de contrôle des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA). Des méthodes de leur détection, en usage chez les professionnels (service d'inspections, industriels, chercheurs) existent à cet effet et sont sans cesse améliorées pour les rendre plus fiables. **(DIRECTIVE 96/23 /CE, 1996)**

Le **Premi®Test** est un test basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus* inclus dans de la gélose nutritive. Cette bactérie est sensible à de nombreuses familles d'antibiotiques et aux sulfamides. **POPELKA et al (2005)** ont montré, lors d'études de validation de la méthode sur de la volaille que les limites de détection du Premi®Test sont égales ou supérieures aux LMRs pour la plupart des antibiotiques (macrolides, tétracyclines, sulfamides) (cf. tableau N° 2), avec les limites de détection les plus basses pour les  $\beta$ -lactamines. Les seuils de détection détaillés du Premi®test des résidus d'antibiotiques dans différentes denrées sont représentés dans l'annexe N3 de cette partie.

Depuis 2006, elle est reconnue comme une méthode officielle dans de nombreux pays comme la France (DGAL/SDRRCC/N20068240) et est validée par l'Agence Française de Normalisation **(AFNOR, 2006)**.

Tableau N° 2 : Seuils de détectabilité des principales familles d'antibiotiques par le Premi®Test par rapport aux LMRs dans le muscle (AFNOR, 2006).

Famille	Sulfamide	Tétracycline	Macrolide	$\beta$ -lactamine	Aminosides
Antibiotique	Sulfadimérazine	Oxytétracycline	Tylosine	Amoxicilline	Gentamycine
LMR (muscle) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	100	100	100	50	50
Limite de détection	2XLMR	2XLMR	LMR	0.5XLMR	>2XLMR

Le **Premi®test** est un test qui requière un minimum pour la préparation des échantillons et des équipements très simples (**MOATS, 1998**), il est facile d'utilisation, le coût est très bas et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons dans un délai relativement court. Enfin, les tests d'inhibition microbiologique incluant le Premi®test représentent la première étape de tout plan de surveillance des résidus d'agents antimicrobiens dans les denrées alimentaires d'origine animale. (**DE BRABANDER et al, 2009**)

Le **Premi®test** a été validé par de nombreux laboratoires européens et utilisé par différentes industries pour leurs programmes de surveillances :

- Central Science Laboratory, Executive Agency of the UK Government Department Defra (United Kingdom) : Premi®Test est utilisé au Royaume-Uni dans le programme national de surveillance,
- The workgroup „pharmakologisch wirk same Stoffe“ (GDCh Germany) : Pre®mitest peut être utilisé pour la self-surveillance en Allemagne (conformément à la directive **2002/657/EC**),
- TNO Nutrition and Food research (The Netherlands) : l'industrie de production de poulet en Hollande procède à la recherche des résidus d'antibiotiques par le Premi®Test,
- *Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) Fougères* in France, laboratoire de référence de recherche des résidus d'antimicrobiens dans les denrées alimentaires,
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) resaerch center, performance tested (USA),
- En Russie, l'utilisation du Premi®test est réglementée par le règlement no : 14.6/01921,

- Belgium, Slovak Republic, Czech, Serbia, Hong Kong, Taiwan, Albania and South Africa. Selected in China as the national standard test by the Shanghai enter-exit Inspection and Quarantine Bureau. **(AFNOR, 2014)**

#### 2.2.1.2. Calibration du pH mètre

Pour la calibration, nous avons utilisé deux solutions tampons, la première à pH=4 et la seconde à pH=10

Nous émergeons la sonde du pH mètre dans la première solution tampon pH= 4 et il faut attendre jusqu'à ce que l'appareil affiche une valeur stable.

Nous rinçons la sonde par de l'eau déminéralisée ensuite nous émergeons la sonde du pH mètre dans la deuxième solution tampon à pH=10. Dès que nous obtenons une valeur stable du pH nous retirons la sonde et nous la rinçons avec de l'eau déminéralisée.

Cette opération nous permettra de mesurer le pH des échantillons de miel.

#### 2.2.1.3. Préchauffage des échantillons au bain-marie

- Allumage du bain-marie et immersion de son thermostat par de l'eau déminéralisée.
- Fixation de la température à 45c°
- Prendre cinq grammes de chaque échantillon et laisser chauffer dans le bain-marie pendant 30 minutes.

#### 2.2.1.4. Préparation des échantillons

a) Dilution de l'échantillon : Nous prenons à chaque fois 5g de l'échantillon de miel déjà préchauffés dans le bain-marie et nous les diluons dans de l'eau distillée avec un rapport volume/volume, puis on mesure le pH du miel dilué (*cf. Annexe N°3. Première partie*).

b) Ajustement du pH du miel : le miel est une denrée alimentaire qui possède un pH acide. Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5, elle est due à la présence des acides organiques (**BOGDANOV et Al ,2004**). Selon **Schweitzer (2005)**, les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellat, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

Pour le bon déroulement du protocole d'analyse et afin de garantir des résultats fiables, nous devons opérer à un pH compris entre 5,2 et 6,8, pH permettant la germination des

spores du *Bacillus* contenues dans les ampoules du test (**R-BIOPHARM, 2010**) (*cf. annexe N°1. Première partie*).

L'ajustement du pH se fait par l'addition d'une solution basique aux échantillons dilués au préalable. La solution est à base d'hydroxyde de sodium (NaOH) avec une concentration de 0,1 mg / ml (40 mmol /ml).

Nous commençons par ajouter une quantité de la solution NaOH qui équivaut au volume de l'échantillon et nous mesurons le pH de la solution, si le pH mesuré est compris entre 5, 3 et 6,8 (pH optimal pour le test) nous arrêtons le rajout de la solution NaOH, sinon à chaque fois nous rajoutons le quart, la moitié ou la totalité de ce volume jusqu'à l'obtention du pH optimal.

Lorsque le pH optimal est atteint, prendre 100 microlitres de chaque solution de miel et les mettre dans les ampoules du **Premi®test**.

#### 2.2.1.5. Incubation

L'incubation des échantillons préparés faite par le biais d'un incubateur spécifique pour le Premi®test et elle comporte deux étapes :

- Un préchauffage à 80°C pendant 10minutes qui permettra la germination des spores,
- Une Incubation proprement dite à 64c pendant 3 heures.

#### 2.2.1.6. Principe du test

Premi®test est basé sur l'inhibition du développement de *Bacillus stearothermophilus*, un micro-organisme très sensible à de nombreux résidus d'antibiotiques. (*Voir. Figure N°1*)

Un nombre standardisé de spores est enrobé dans un excipient de gélose contenant des nutriments sélectionnés. Lorsque le filtrat de miel aura été ajouté dans l'ampoule de Premi® test et mis en incubation à 64°C, les spores vont germer. Ces spores germées vont se multiplier et acidifier le milieu en l'absence de substances inhibitrices. Ce qui se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui virera du violet au jaune.

Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection) le germe test ne se développera pas et la couleur restera violette.

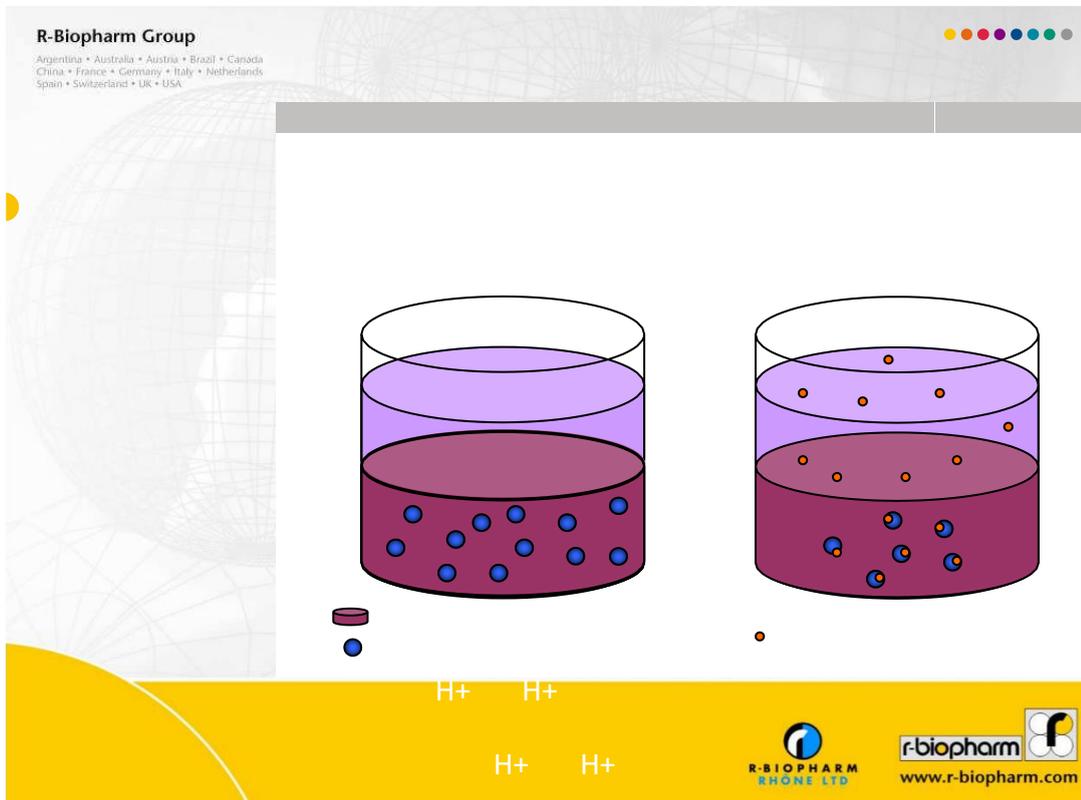


Figure N°1: principe du Premitest (source: R-BIOPHARM, 2011)

### 2.2.1.7. Précautions à prendre

Ce test extrêmement sensible aux antibiotiques et autres substances inhibitrices : il faut donc éviter tout risque de contamination par de telles substances. Il est conseillé de bien se laver les mains avant le test et de se les sécher avec du papier absorbant ou une serviette propre.

### 2.2.1.8. Utilisation

- bien se laver les mains avant de commencer le test.
- découper le nombre d'ampoules nécessaires avec une paire de ciseaux sans abimer le film d'aluminium qui protège les ampoules voisines.

- Enlever prudemment le film de protection recouvrant le nombre d'ampoules souhaitées (ne pas ouvrir plus d'ampoules que nécessaire)
- Pipetter dans l'embout 100µl de solution préparée et le verser sur gélose, sans la toucher.
- utiliser un nouvel embout jetable de seringue pour chaque prélèvement.
- Il est important d'éliminer l'eau restant de l'ampoule.
- fermer l'ampoule de test par le film fourni pour éviter l'évaporation.
- faire un préchauffage pendant 10 minutes à 80°C et incubation pendant 3 heures à 64°C.
- il est fortement recommandé de faire parallèlement un témoin négatif par espèce. Lire les résultats du test lorsque le témoin négatif aura changé de couleur (environ 3 heures).

#### 2.2.1.9. Lecture des résultats du test

- Lire la couleur uniquement dans les deux tiers inférieurs de l'ampoule.
- un changement de couleur évident (du violet au jaune) indique une absence d'antibiotiques.
- s'il n'y a aucun changement de couleur ou un changement de couleur peu évident, cela indique une présence d'antibiotiques

#### 2.2.1.10. Témoin positif

Il est recommandé de tester régulièrement un témoin positif (protocoles fournis sur demande) pour vérifier la bonne application du test. La régularité est à fixer par les utilisateurs du test. À conseiller lors de la 1ère utilisation et ensuite de temps en temps.

### 2.3. **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

#### 2.3.1. **Mesures du pH**

La mesure du pH est une étape importante pour la bonne réalisation du test, vu qu'il influence directement sur la germination des spores. Les valeurs du pH des échantillons variées entre 3,33 pour la minimale et 4,74 pour la maximale (*cf. Annexe N°3 de la première partie*). Le miel est une denrée alimentaire qui possède un pH acide. Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5, elle est due à la présence des acides organiques (**BOGDANOV et Al, 2004**). Selon **Schweitzer (2005)**, les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellat, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

Après l'addition d'une solution basique (hydroxyde de Sodium :  $NaOH$ ) aux échantillons, la valeur du pH a augmenté nettement pour donner un pH minimum de 5,30 et un pH maximum de 6,80. Le pH recommandé par le producteur est compris entre 5,8 et 6,2 avec la possibilité d'aller jusqu'au pH neutre dans la limite haute de la mesure (*cf. ANNEXE N°2 de la première partie/ R. BIOPHARM, 2010*).

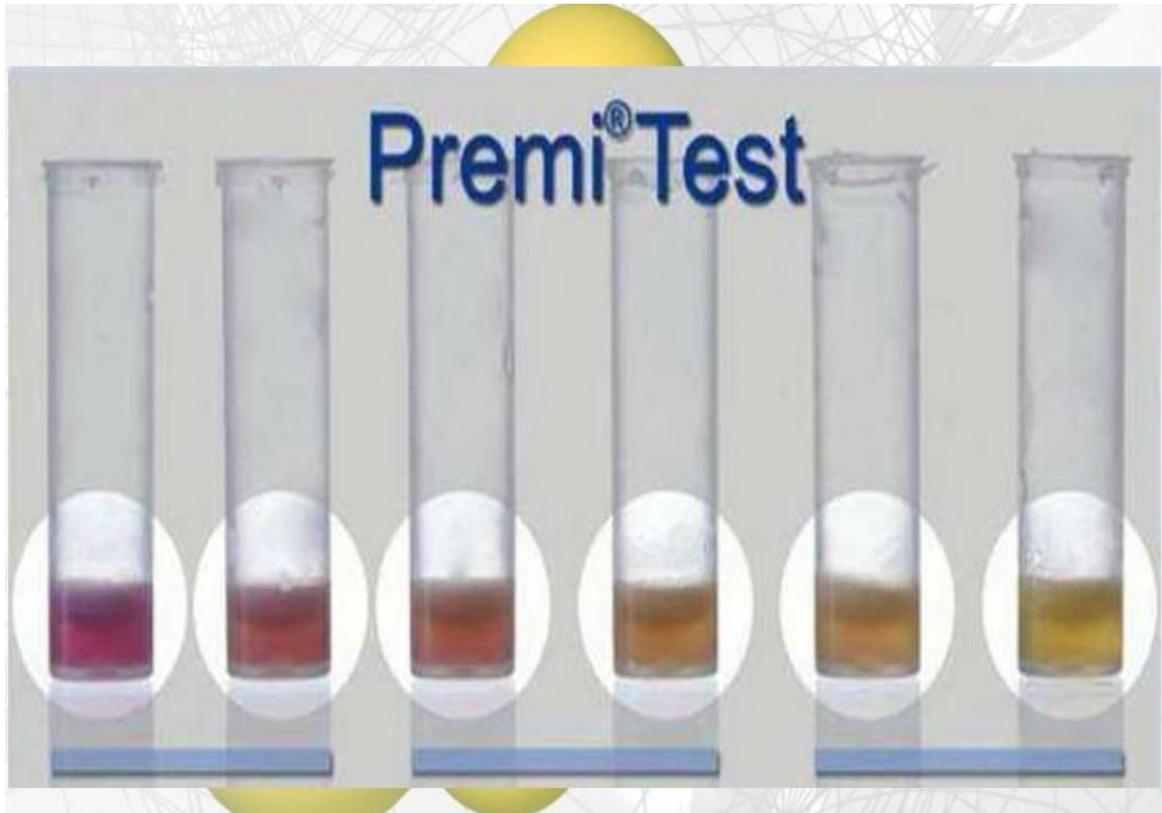
Ce qu'il y a à noter c'est que vu la différence de pH pour chaque échantillon de miel, le volume de la solution de  $NaOH$  rajoutée varie d'un échantillon à un autre (*cf. Annexe N°3 de la première partie*).

D'autres parts, le pH de la solution d'hydroxyde de Sodium varie d'une série d'analyse à une autre et cela est en relation directe avec la valeur du pH de l'eau déminéralisée utilisée puisque la concentration d'hydroxyde de Sodium reste toujours constante (0,1 mg/ ml). Variation qui n'a pas une influence sur le pH final.

### **2.3.2. Résultats de l'analyse PREMI®TEST**

Les spores germées vont se multiplier et acidifier le milieu en l'absence de substances inhibitrices. Ce qui se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui virera du violet au jaune. Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection) le germe test ne se développera pas et la couleur restera violette. (**R. BIOPHARM, 2010**). Le virement de couleur observé est représenté dans la figure N° 2.

f



Positif  
CONCEN > LOD

POS/NEG —  
CONCEN = LOD

NEG  
CONCEN < LOD

Figure N° 2 : les différents virements de couleur lors d'analyse « Premi®Test » (source R Biopharm AG, 2011)

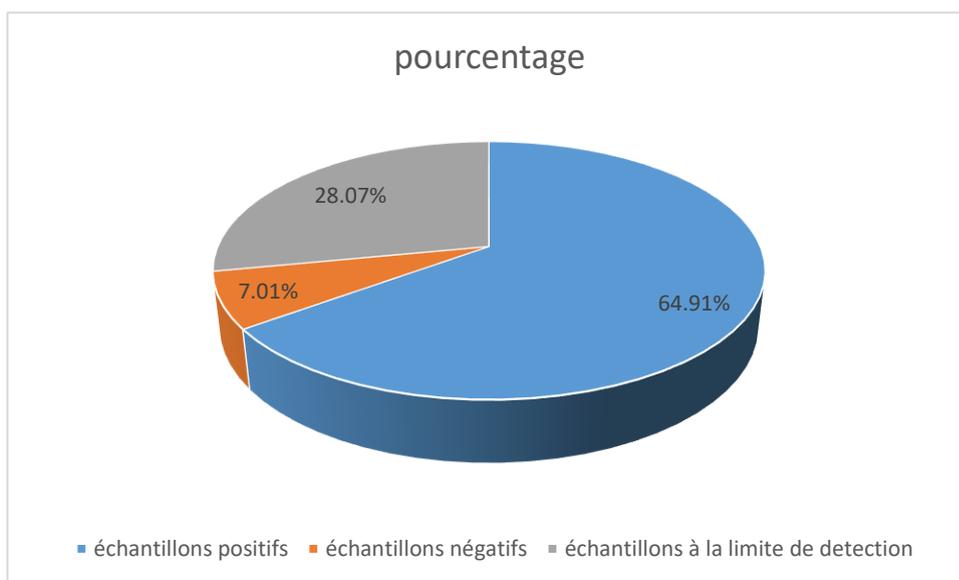
L'analyse des 115 échantillons de miels a révélé les résultats suivants (voir le tableau N° 3) :

**Tableau N° 3 : nombre d'échantillons positifs et négatifs révélés par l'analyse Premi®test**

	Désignation	Nombre total	Échantillons positifs(+)	Échantillons négatifs (-)	Échantillons à la limite de détection (+/-)
<b>Miels locaux</b>	<b>Miel Constantine</b>	14	02	10	02
	<b>Miel Alger</b>	15	08	05	02
	<b>Miel Mansoura</b>	03	00	01	02
	<b>Miel Hammadia</b>	04	03	00	01
	<b>Miel Zeghaia</b>	03	01	00	02
	<b>Berhoum</b>	02	02	00	00
	<b>M'sila</b>	01	00	00	01
	<b>Jijel</b>	01	01	00	00
	<b>El Eulma</b>	01	01	00	00
	<b>Ain Makhlouf (guelma)</b>	01	01	00	00
	<b>Bordj Snoussi</b>	01	01	00	00
	<b>Selaoua Ainouna</b>	01	00	01	00
	<b>Bordj Sabat</b>	01	00	01	00
	<b>Lerbea</b>	01	00	00	01
	<b>Ras el ayoun</b>	01	01	00	00
	<b>Tedj Moutt</b>	01	01	00	00
	<b>Laghouat</b>	01	00	01	00
	<b>Aflou</b>	01	00	00	01
	<b>Sidi Makhlouf</b>	01	01	00	00
	<b>Selaoua Anouna (Boudeb)</b>	01	01	00	00
	<b>Blida</b>	01	00	01	00
	<b>Selaoua Ainouna (Lebabra)</b>	01	00	01	00
	<b>Ain Ghrab</b>	01	01	00	00
<b>Miels importés</b>	<b>Lune de miel France</b>	01	00	01	00
	<b>MIEL UKRAINE</b>	01	01	00	00
	<b>Miel el chiffa</b>	55	36	03	16
	<b>totaux</b>	<b>115</b>	<b>62</b>	<b>25</b>	<b>28</b>

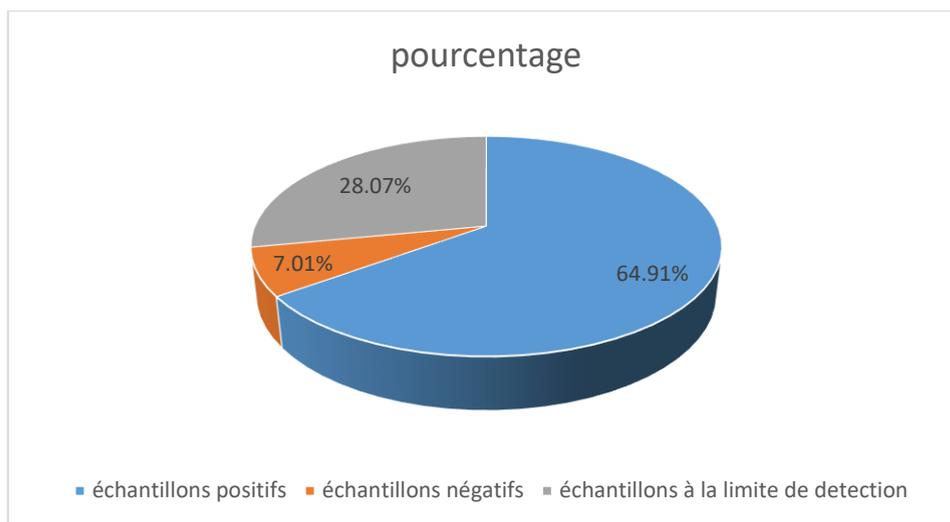
Sur le total des 115 échantillons, 62 se sont révélés positifs, 28 à la limite de détection et enfin 25 négatifs. Ces chiffres correspondent respectivement aux pourcentages suivants : 53,91% d'échantillons positifs, 24,34% à la limite de détection et 21,73% négatifs.

**Remarque** : les échantillons à la limite de détection du test sont considérés comme positifs ce qui ramène le nombre **d'échantillons positifs de miel à 90 ce qui correspond à un pourcentage de 78,25%**. (Voir figure N°3)



**Figure N° 3 : graphique des pourcentages des échantillons positifs, négatifs et à la limite de détection sur un total de 115.**

Sur les 58 échantillons de miel produit localement, l'analyse nous a permis de constater que 22 d'entre eux ont été négatifs, 12 échantillons à la limite de détection du test et 25 positifs. Cela correspond aux pourcentages suivants : 37,93% pour les échantillons négatifs, 20,68% à la limite de détection et 43,10% positifs. À noter qu'en rajoutant le pourcentage des échantillons à la limite de détection nous obtenons un **pourcentage définitif des positifs de 63,78%**. Les pourcentages sont représentés dans la figure N°4.

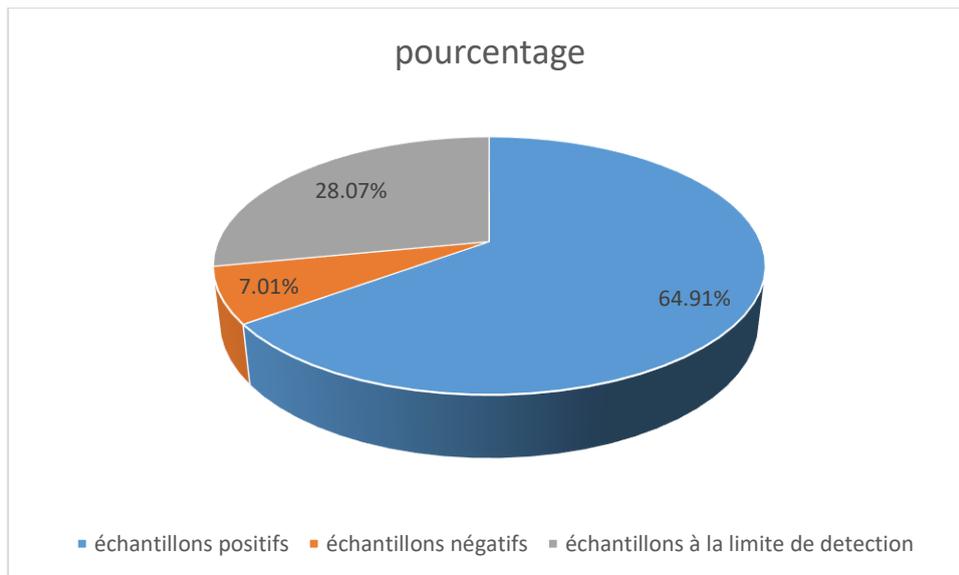


**Figure N° 4 : graphique des pourcentages des échantillons de miel local, positifs, négatifs et à la limite de détection sur un total de 58.**

Pour le miel d'importation, nous avons choisi une marque très répandue dans le commerce local et très prisée par une large tranche de la population pour son prix abordable. 55 échantillons ont été récupérés dans le commerce local.

**NB : deux échantillons de miel apportés de France et d'Ukraine à titre personnel ont été analysés par nos soins, juste pour pouvoir faire une comparaison expérimentale entre les deux marques.**

Parmi les 55 échantillons de miel importé vendu au commerce local, 36 étés positifs, 16 à la limite de détection et 03 négatifs tandis que l'échantillon apporté de France été négatif et celui de l'Ukraine été positif ce qui ramène le nombre final des échantillons positifs à 37 et le nombre final d'échantillons négatifs à 04 et le nombre final des échantillons à la limite de détection reste inchangé en l'occurrence 16. Ces chiffres correspondent respectivement aux pourcentages suivants : 64,91% d'échantillons positifs, 7,01% négatifs et 28,07% à la limite de détection ce qui porte le pourcentage final des **échantillons positifs à 92,98%**. Ces pourcentages sont représentés dans la figure N°5.



**Figure N°5 : graphique des pourcentages des échantillons de miel importé, positifs, négatifs et à la limite de détection sur un total de 57**

La comparaison entre miels produit localement et le miel importé révèle que sur un total de 115 échantillons, dans la catégorie des échantillons positifs au test, 37 positifs appartiennent au miel importé contre 25 du miel local. Dans la catégorie des échantillons à la limite de détection, 16 appartiennent au miel importé contre 12 au miel produit localement. Concernant les échantillons négatifs au test, 4 appartiennent au miel importé contre 22 du miel local. Ces chiffres correspondent respectivement aux pourcentages suivants :

- Échantillons positifs : 32, 17% pour le miel importé contre 21,37% pour le miel local,
- Échantillons à la limite de détection : 13,91% pour le miel importé contre 10,43% pour le miel local,
- Échantillons négatifs : 3,47 pour le miel importé contre 19,13% pour le miel local.

Ces pourcentages sont représentés dans le graphique suivant (voir. Figure N°6).

Il est important de souligner que les échantillons à la limite de détection sont considérés comme positifs dans ce test, ce qui porte le nombre final des positifs à 51 échantillons dans la catégorie du miel importé contre 37 pour le miel produit localement. Ces chiffres correspondent respectivement aux pourcentages suivants : 46,08% d'échantillons positifs pour le miel importé contre 31,80% pour le miel produit localement.

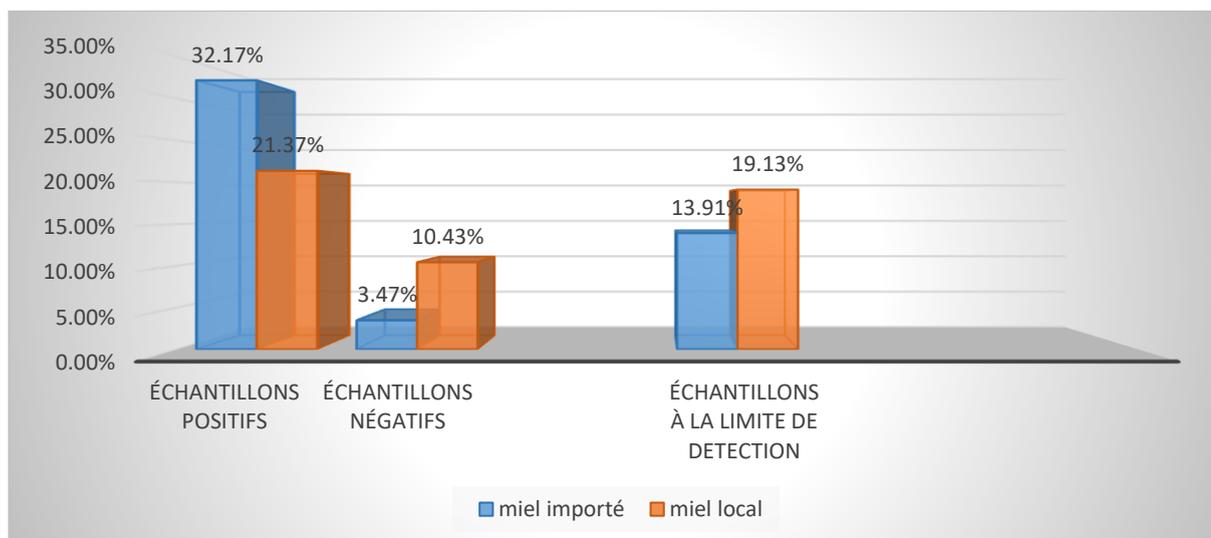


Figure N° 6 : graphique représentant les résultats de la comparaison entre miel importé et miel local

### 2.3.3. Analyse statistique

Pour effectuer une comparaison objective entre les résultats obtenus sur les échantillons de miel local et ceux du miel importé, l'utilisation d'un test d'hypothèse statistique s'impose d'elle-même. Comme les résultats obtenus sont exprimés sous forme de proportion (voir tableau N°4), nous avons utilisé pour la comparaison des résultats obtenus le test Z de comparaison de deux proportions indépendantes.

Tableau N° 4 : représentant les proportions obtenues après analyse des échantillons par Premi® test

	Échantillons (+)	Échantillons (-)	Total	Proportion des échantillons (+)
<b>Miel local</b>	<b>36</b>	<b>21</b>	<b>57</b>	<b>0,6316</b>
<b>Miel importé</b>	<b>53</b>	<b>4</b>	<b>57</b>	<b>0,9298</b>
<b>total</b>	<b>89</b>	<b>25</b>	<b>114</b>	
<b>Proportion totale des échantillons</b>	<b>0,7807</b>	<b>0,2192</b>	<b>1</b>	

La première étape dans un test d'hypothèse c'est d'émettre l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) est son Alternative ( $H_1$ ). Dans notre cas, on cherche à prouver qu'il y'a une différence significative entre la proportion des échantillons de miel local positifs à l'analyse et les échantillons positifs du miel importé. Les deux hypothèses seront formulées comme suit :

Hypothèse  $H_0$  : la différence entre les deux proportions( $P$ ) est proche de 0 ( $P_{\text{importé}}= P_{\text{local}}$ )

Hypothèse  $H_1$  : il y'a une différence significative entre les deux proportions ( $P_{\text{importé}} \neq P_{\text{local}}$ ).

La deuxième étape consiste à choisir le test adéquat à la nature des résultats obtenus, dans notre cas il s'agit de variable qualitative bimodale (positif/ négatifs) où les valeurs sont exprimées par des proportions. Le test Z de comparaison de deux proportions indépendantes est adapté à la nature des résultats de l'expérimentation effectuée.

La troisième étape est de fixer un seuil de risque ( $\alpha$ ) qui représente la probabilité théorique de rejeter ( $H_0$ ) alors qu'elle soit vraie. Il est généralement fixé à des valeurs correspondant à : 10, 5 ou 1%.

Pour la quatrième étape, nous avons calculé la probabilité observée de rejeter  $H_0$  alors qu'elle est vraie, le résultat s'exprime par ce qu'on appelle la P-value et plus cette valeur est petite est plus le risque d'erreur est minime.

En dernier lieu vient la prise de décision, c.-à-d., confirmer ou infirmer qu'il y'a une différence significative entre les échantillons positifs du miel local et les échantillons positifs du miel importé en fonction de la valeur de **P. (SINCICH. T, 1996) ; (FLEISS J.L, 1981)**

**NB : tous les tests effectués sont réalisés à l'aide du logiciel XLStat pour plus de précision**

### 2.3. 3.1. Résultats de l'analyse statistique

*Les résultats de l'analyse statistique sont représentés dans le tableau N°5 :*

Tableau N° 5 : résultats de l'analyse statistique par le test Z pour deux proportions indépendantes

Test z pour deux proportions / Test bilatéral : Positifs/négatifs		Test z pour deux proportions / Test bilatéral : Positifs miel local/positifs miel importé	
Différence	0,5615	Différence	0,2982
z (Valeur observée)	5,9952	z (Valeur observée)	3,8474
z (Valeur critique)	1,9600	z (Valeur critique)	1,9600
p-value (bilatérale)	< 0,0001	p-value (bilatérale)	0,0001
alpha	0,05	alpha	0,05
IC à 95%	(0 ,3779 ; 0,7451)	IC à 95%	(0,1463 ; 0,4501)

**Interprétation du test :** Étant donné que la P-value calculée est inférieure au niveau de signification Alpha égal à **0,05 (5%)**, on doit rejeter l'hypothèse nulle H0 et retenir l'hypothèse alternative H1, le risque de rejeter l'hypothèse H0 alors qu'elle est vraie est inférieur à **0,01%**.

Les résultats du test statistique nous emmène à conclure que :

- a) sur le total des 115 échantillons prélevés (miel local est importé) le pourcentage des positifs (**78,02%**) est significativement différent du pourcentage des négatifs (**21, 98%**);
- b) La comparaison entre les échantillons positifs du miel local et ceux du miel importé démontre qu'il y'a une différence significative entre le pourcentage des positifs dans le miel local (**63,16%**) et le pourcentage des positifs dans le miel importé (**92,98%**) en faveur de ce dernier ;

- c) Les résultats obtenus pour les échantillons peuvent être élargis à l'ensemble de la population avec un intervalle de confiance à 95% autour de la différence des proportions qui est compris entre **(0,3779 ; 0,7451)** entre les échantillons positifs et négatifs ;
- d) De même que pour les échantillons positifs du miel local et les échantillons positifs du miel importé, la différence de proportions est comprise dans un intervalle de confiance à 95% qui a pour valeurs **(0,1463 ; 0,4501)**.

#### 2.3.4. Discussions

Le dépistage est une étape critique et primordiale, qui doit détecter le mieux possible les résidus d'antibiotiques au niveau des limites réglementaires (Eg. LMR) pour éviter la présence de résidus dans l'alimentation. De plus, comme tous les résultats positifs à cette étape sont obligatoirement confirmés par une méthode physico-chimique coûteuse, il faut éviter de déclarer des échantillons exempts de résidus comme positifs. C'est pourquoi les méthodes de dépistage doivent être validées afin de déterminer leurs performances et vérifier qu'elles sont adaptées à l'usage qui va en être fait. De plus, la validation des méthodes analytiques est une exigence réglementaire dans le domaine des résidus (décision européenne 2002/657/CE) et normative pour l'accréditation des laboratoires d'essais (NF EN ISO/CEI 17025). (**GAUDIN. V, 2012**)

Le **Premi®test** est un test dépistage initialement non destiné à la détection des contaminants dans le miel à cause du pH faible dans la plupart des variétés de miel, mais depuis 2014 une méthode d'ajustement du pH a été mise au point par **R-Biopharm (2014)** rendant l'usage de ce test possible pour détecter les résidus de certains antibiotiques (pénicilline, tétracycline, sulfamide, aminosides). Ce qui explique le nombre assez restreint d'études concernant cette méthode d'analyse des résidus de contaminants dans le miel

Concernant la période de stockage maximale pour ce kit, d'après notre expérience la durée de vie du kit **Premi®test** est de 16-24 mois s'il est stocké sous de bonnes conditions incluant le stockage continu sous régime de froid avec un minimum d'humidité, passé ce délai, la viabilité des bactéries diminue considérablement donc il n'est pas recommandé de l'utiliser ladite période passée. Cette longue période permet de stocker de grandes quantités si le kit est utilisé comme test rapide de dépistage dans un plan de pharmacovigilance à l'échelle nationale.

L'analyse des échantillons de miel se pratique en parallèle avec celle d'un témoin négatif auquel nous rajoutons seulement de l'eau physiologique stérile pour vérifier la validité du kit utilisé.

Concernant la méthode d'analyse la seule contrainte rencontrée se situe dans l'étape d'ajustement du pH des échantillons de miel vu la variation du pH de ces derniers à cause de l'origine et des conditions de stockage ce qui peut augmenter le taux de faux négatif, mais nous

avons palliés à ce problème en augmentant la concentration de la solution de dilution. D'autres parts, selon **Gaudin et al (2012)**, l'augmentation du volume de l'échantillon de 10% peut augmenter la fréquence des faux positifs de 100%, mais dans la routine ce critère peut être contrôlé. Le taux de faux positifs constaté pour le **Premi®test** avoisine les 14%, ce taux plus ou moins élevé peut être dû au mauvais contrôle du volume des échantillons analysés, mais dans l'ensemble le test reste performant en respectant les bonnes conditions d'analyse.

La comparaison de nos données avec d'autres travaux reflète une très grande similitude dans la méthode d'analyse adaptée. Ainsi :

Pour **Gaudin et al (2012)**, la méthode d'analyse utilisée pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le miel par **Premi®test** été similaire à celle adaptée pour notre étude que ça soit la durée et la température du préchauffage ou la méthode d'extraction et de purification ou même la période d'incubation des échantillons. Parmi les constatations notables relevées dans cette étude, on peut citer : le fait que préchauffer les échantillons pendant une heure au lieu de 30 minutes peut diminuer le taux des faux positifs. D'autres parts, les limites de détection du test observés pour l'oxytétracycline par exemple est de 10 µg/kg valeur qui est plus basse que les limites recommandées par le fabricant (75 µg/kg) ce qui augmente significativement les performances du test

**Stead et al, 2004**, dans leurs recherches ont utilisés le **Premi®test** comme test de screening pour rechercher les résidus de tétracycline, le kit utilisé avait comme limite de détection (**LOD**) : tétracycline (50 µg/kg), oxytétracycline (75µg/kg) et chlorotétracycline (80 µg/kg). Les échantillons été préchauffés à 45°C pendant 30 minutes avec deux étapes d'incubation : une première à 80°C pendant 2 minutes et la deuxième à 64°C pendant 3 heures ce qui concorde avec les limites fixées pour notre étude.

Dans ses travaux, **Chuleeporn, 2013**, a utilisé un kit similaire au **Premi®test** pour détecter les résidus du groupe tétracycline à la seule différence qu'il n'a utilisé qu'une période d'incubation à 65°C pendant 2-3 heures et la limite de détection de son test été de 10µg/kg.

En Algérie la mise en place du Programme algérien de Surveillance des Contaminants et dans les Aliments (PASCRA) n'a été entamée que durant l'année 2015, le **Premi®test** été parmi les tests rapides retenus pour la détection des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires y compris le miel et trois wilayas pilotes ont été sélectionnée pour cette expérience : Blida, Batna et Tébessa. (**KEBIR. A, 2016**)

Mis à part cela, les travaux sur la détection des résidus d'antibiotiques dans le miel en Algérie sont quasi inexistantes.

À l'issue de notre étude, 78,02% des échantillons prélevés contenaient des résidus d'antibiotiques. En considérant les seuils de sensibilité du **Premi®Test** et les limites fixées par la réglementation, les échantillons positifs contiendraient : des résidus de sulfamides, de tétracyclines et d'aminosides de chloramphénicol et de β-lactamines à des teneurs supérieures

au seuil de résidus recommandés, parce qu'aucune LMR n'a été fixée pour les résidus d'antibiotiques dans le miel.

Pour les résidus de sulfamides, de tétracyclines, d'aminosides et de chloramphénicol, les échantillons positifs pourraient donc être déclarés «non consommables et potentiellement dangereux pour la santé humaine».

En parallèle, nous avons observé un taux élevé des positifs dans le lot des échantillons de miel importé (92,98%) par rapport au taux des positifs appartenant au lot du miel local (63,16%), cette différence de proportion peut être due au fait que la production locale de miel est artisanale dans des régions assez isolées alors que le miel importé est issu d'une production industrielle chose qui favorisent la propagation des maladies est par conséquent la fréquence des traitements.

Dans le monde, il y a bon nombre de rapports qui mentionnent la présence des résidus d'antibiotiques dans des échantillons de miel, certains d'entre eux sont énumérés là-dessous à titre de comparaisons avec nos résultats :

**Reybroeck (2003)**, reporter la présence des résidus de plusieurs antibiotiques notamment : la streptomycine, la tétracycline, sulfonamide, B-lactames et le chloramphénicol à des taux très élevés dans des échantillons de miel à la période entre 2000-2001.

Dans une autre étude effectuée par **Vidal et al (2009)**, sur un total de 251 échantillons de miel analysés, 19% d'entre eux se sont révélés contaminer par les résidus de tétracycline ainsi que d'autres antibiotiques incluant : la streptomycine, sulfonamide et la ciprofloxacine à l'état de traces.

En Suisse, 75 échantillons de miel prélevés dans le commerce ont été analysés, 13 échantillons (17%) parmi les 34 issus de pays asiatiques contenaient des résidus de chloramphénicol avec une concentration mesurée entre 0.4 et 6.0 µg/kg, six échantillons contenaient approximativement 0.8–0.9 µg/kg et deux d'entre eux 5 µg/kg. **(ORTELLI. D, 2004)**

## Conclusion de la première partie

À l'issue de cette première partie, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Nous avons mis au point une méthode de dépistage rapide des résidus d'antibiotiques dans le miel basée sur le kit **Premi®Test**, cette dernière est peu coûteuse, facile à mettre au point et applicable à grande échelle ce qui la rend bien indiquée pour être utilisée comme test rapide de screening des résidus dans un plan national de pharmacovigilance/ pharmacosurveillance comme le programme national (**PASCRA**). La méthode d'analyse par **Premi®test** est fiable performante (seuil de détection assez bas) et le taux de faux positifs est acceptable alors que celui de faux négatifs est proche de zéro.

Néanmoins, cette dernière n'est pas exempte d'inconvénients qu'il faut considérer lorsqu'on adopte cette méthode d'analyse, comme le fait qu'elle demeure une méthode qualitative seulement et les résultats obtenus doivent être confirmés par des méthodes physico-chimiques (HPLC, CPG, MS) ou le temps d'analyse qui peut s'avérer plus ou moins long.

Concernant les résultats obtenus, le taux d'échantillons positifs est alarmant et celui des échantillons du miel importé l'est encore davantage, ce qui implique plus de vigilance de la part des autorités vis-à-vis de l'origine et la traçabilité du miel importé, en renforçant la réglementation régissant le commerce externe ainsi que l'adoption de méthodes de contrôle fiables et performantes aux frontières.

Pour ce qui est des miels produits localement, le taux des échantillons positifs révélé par l'analyse **Premi®Test** reste assez élevé, ce qui nécessite plus de sensibilisation des apiculteurs sur les dangers que représentent les résidus d'antibiotiques pour la santé publique et en renforçant les mesures de contrôle en impliquant les vétérinaires dans les plans de surveillance.

Enfin, les résultats obtenus vont servir comme point de départ pour la deuxième partie de cette étude, car tous les échantillons révélés positifs par le **Premi®Test** doivent subir un autre procédé d'analyse pour l'identification et la quantification des résidus d'antibiotiques détectés par ce test.

# **DEUXIÈME PARTIE : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE MIEL PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) EN PHASE INVERSE**

## **1. INTRODUCTION**

Les échantillons révélés positifs par l'analyse Premi®test, doivent subir impérativement un second procédé d'analyse dit de confirmation pour déterminer la nature de la substance détectée ainsi que sa quantité mesurable dans les échantillons pour la comparer avec les seuils critiques adoptés par les organismes de contrôle nationaux et internationaux.

Ces procédés d'analyse sont pour la plupart de nature physico-chimique (HPLC, CPG, SM), ils sont à l'origine très coûteux, longs à mettre au point et nécessitent un savoir-faire spécial par l'analyste ; ils passent par plusieurs étapes expérimentales avant d'approuver leurs résultats, étapes que nous allons décrire brièvement pour une meilleure compréhension du sujet traité dans cette deuxième partie.

D'abord, il faut sélectionner la technique analytique, c'est-à-dire choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques publiées dans la littérature ou maîtrisées par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer le ou les analyte(s) représentatif(s) du problème analytique à traiter. Cette démarche repose entièrement sur le savoir-faire et l'expertise de l'analyste.

Le choix de la méthode est le point de départ véritable de la validation. Il résulte d'un compromis entre les possibilités instrumentales du laboratoire, le coût d'une mesure et les performances requises. **(FEINBERG. M, 2009)**

Une fois la méthode sélectionnée, il est souvent nécessaire d'effectuer plusieurs expériences pour l'optimiser. Cette optimisation de la méthode peut être très complexe avec une procédure originale. En effet, en raison du nombre important de paramètres impliqués dans le développement des méthodes d'analyse, il est difficile de trouver l'ensemble des niveaux optimaux des paramètres de la méthode analytique. **(DUARTE A.C., 2006)**

La validation ne doit intervenir qu'après la mise au point complète de la méthode, l'objectif de la validation est de démontrer que la méthode employée permet d'atteindre des objectifs techniques définis à l'avance. La clause 5.4.5.1 de la norme **ISO 17025 (2005)** donne une définition de la validation ; « la validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves

objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ». **(FEINBERG. M, 2009)**

Les principaux critères de validation sont ceux qui sont largement reconnus et couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse **(ICH, 2005)** ; **(US FEDERAL GOVERNMENT, 2001)** ; **(EURACHEM, 1998)** et s'articulent comme suit :

- Spécificité-sélectivité,
- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage),
- Linéarité (des résultats),
- Fidélité (Répétabilité et Fidélité intermédiaire),
- Justesse,
- Exactitude
- Limite de détection (LD),
- Limite de quantification (LQ),
- Intervalle de dosage,

Lorsque la validation s'avère conforme, la vie de la méthode se poursuit par son utilisation en routine. L'obligation de maîtriser la qualité implique un contrôle permanent des performances dans le temps. La norme **ISO 17025 (2000)**, par exemple **(ISO, 2000)**, exige que les méthodes d'analyse soient contrôlées lors de l'utilisation de routine afin de garantir la fiabilité des résultats analytiques qui sont produits pendant les séries de tous les jours et donc des décisions subséquentes.

De même, la FDA **(US FEDERAL GOVERNMENT, 2001)** précise que, une fois la méthode d'analyse validée, son exactitude doit être contrôlée régulièrement afin de s'assurer que la méthode continue à fonctionner de façon satisfaisante.

La méthode classique pour vérifier la fiabilité d'un système est de répéter l'analyse d'un échantillon de référence à intervalles réguliers et de le surveiller avec les techniques de maîtrise statistique des procédés (MSP). **(ROZET. E, 2008)**; **(RIUS. À, 1998)** ; **(KRINGLE. R.O, 1994)**

Cette deuxième partie comporte quatre chapitres distincts, en commençant par le choix de la méthode d'analyse tout en expliquant les raisons qui nous ont poussés à choisir telles méthodes.

Ensuite nous avons procédé à l'optimisation de la méthode sélectionnée tout en adoptant un plan d'expérience bien précis.

Le troisième chapitre traite de la validation de notre méthode d'analyse ainsi que des différentes méthodes statistiques utilisées pour valider les résultats de l'expérimentation.

Enfin, des conclusions et des recommandations seront émises concernant la méthode d'analyse et son utilisation dans la routine.

## Chapitre premier : choix de la méthode d'analyse HPLC

### **1. CHOIX DES ANTIBIOTIQUES**

En apiculture, les antibiotiques sont mélangés avec des sirops de sucre administrés aux abeilles ou pulvérisés sur la ruche, afin de lutter contre les maladies. Ainsi, des résidus peuvent être retrouvés dans les produits d'apiculture, tels que le miel ou la gelée royale, très prisée pour ses propriétés. Leurs analyses dénoncent l'utilisation fréquente de plusieurs familles d'antibiotiques. Les antibiotiques comme la streptomycine, la tétracycline, le Chloramphénicol et les sulfonamides sont souvent utilisés en apiculture pour le contrôle des loques européenne et américaine, maladies bactériennes très dangereuses pour l'abeille et qui détruisent les ruches d'une façon rapide et complète. Ces bactéries peuvent contaminer facilement plusieurs ruches par conséquent elles représentent un danger potentiel pour les apiculteurs. L'antibiothérapie est autorisée dans certains pays, mais strictement prohibée dans d'autres comme la Suisse. La Chine est un grand pays exportateur de miel, la plupart des miels commercialisés sont une mixture de miels de différentes origines qui souvent contient des miels chinois en des proportions très larges. En Chine le Chloramphénicol et la streptomycine sont les antibiotiques les plus utilisés en apiculture et leurs résidus sont systématiquement recherchés dans le miel à cause de leur toxicité ainsi que leur capacité à donner des résistances bactériennes. L'usage du Chloramphénicol est banni dans l'Union Européenne depuis 1994 et en Suisse depuis 2000. Pour les denrées provenant de pays où la législation permet l'usage du chloramphénicol, la limite maximale des résidus est fixée à 1µg/kg. **(VIDAL. J.L, 2009) ; (KILINC B, CAKLI S., 2008); (ORTELLI. D, 2004)**

Sur le marché italien, parmi les substances analysées, les sulfamides sont les antibiotiques les plus employés suivis par les tétracyclines, la streptomycine, la tylosine dans les miels d'importation ainsi que le chloramphénicol. La présence de la famille des quinolones dans le miel chinois a été mise en évidence récemment. Il y eut quelques alertes négligeables sur les métabolites des nitrofuranes. **(HAMMEL YV, 2008)**

L'utilisation de la streptomycine en apiculture est légalement permise en Europe et aucune LMR n'est fixée par les autorités, cependant l'usage de la streptomycine dans le miel est banni pour sauvegarder cette image d'un produit thérapeutique naturel du miel. **(VAN BRUIJNSVOORT. M, 2004)**

Le chloramphénicol est un antibiotique à large spectre souvent utilisé en médecine vétérinaire. Récemment, quelques miels vendus dans le commerce international ont été identifiés comme contaminés par des résidus de chloramphénicol. L'Union Européenne (UE) a prohibée l'usage du Chloramphénicol comme un médicament vétérinaire dans la production des denrées d'origine animale.

Aucune limite maximale des résidus n'a été fixée pour le Chloramphénicol, il y a seulement la norme : le niveau de performance minimum requis (MRPL) pour détecter le chloramphénicol et il est fixé à 0,3 µg/kg. (**COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2003**)

Les antibiotiques de la famille des tétracyclines sont communément utilisés en médecine vétérinaire à des fins thérapeutiques et prophylactiques dans les productions animales. Dans ces dernières années, l'usage abondant et dans certains cas inapproprié des tétracyclines a engendré la présence des résidus dans différents tissus animaux qui représentent un danger pour la santé humaine (toxicité et potentiellement des réactions allergiques). D'autres parts, la présence à long terme des résidus des tétracyclines dans les tissus à faible dose peut générer des évolutions des microorganismes provoquant ainsi des phénomènes de résistances. (**SAMANIDOU. V. F, 2005**)

En Belgique, la limite d'action pour la famille des tétracyclines est fixée à 50 µg.kg-1. Depuis le premier juillet 2002, cette valeur est abaissée à 20 µg.kg-1. La France applique une limite de non-conformité pour les tétracyclines dans le miel de 15 µg.kg-1 ; la limite en Grande-Bretagne est fixée à 50 µg.kg-1, alors que le seuil de tolérance en Suisse est de 20 µg.kg-1. (**REYBROECK. W, 2007**)

## **2. CHOIX DE LA MÉTHODE D'ANALYSE**

La Décision de la Commission Européenne (**93/257/CEE**) dans son premier article référence les méthodes de confirmation de la présence des résidus d'antibiotiques : « Les procédés d'analyse de référence à utiliser pour la confirmation de la présence de résidus des substances visées à l'annexe I de la directive 86/469/ CEE, à l' exception des substances chimiques telles que les métaux lourds et l'arsenic, sont les suivants :

- immuno-essai,
- chromatographie en couche mince,
- chromatographie liquide,
- chromatographie en phase gazeuse,
- spectrométrie de masse,
- spectrométrie,

Ainsi que tout autre procédé répondant à des critères comparables aux critères fixés par l'article 3 de la présente décision ».

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse avec un gradient d'élution est souvent utilisée pour l'analyse multi résidus. Elle permet l'analyse de molécules avec des caractéristiques physico-chimiques divergentes. Les analytes sont séparés selon leur hydrophobie par partage entre les phases mobile et stationnaire. En général, une phase aqueuse composée d'eau et une phase organique comme du méthanol ou de l'acétonitrile sont mis en jeu dans la phase mobile.

La phase stationnaire est souvent constituée de silice chimiquement modifiée par greffage de chaîne octadécyl C18 ou alkyle C8. Il existe également d'autres types de greffage comme aminopropyl, cyanopropyl, phényle ou d'autres types de phases stationnaires à base de polymères ou de carbone graphite poreux . **(JANVIER. P, 2010)**

De nos jours, les antibiotiques sont les contaminants le plus présents dans le miel, les antibiotiques suivants ont été détectés dans le miel:

- Sulfonamides: sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamethaxazole, sulfanilamide
- Aminoglycosides: streptomycine
- Tétracyclines: Oxytétracycline, chlortétracycline
- Amphenicols: Chloramphenicol

Il est reporté que les antibiotiques suivants sont utilisés en apiculture, mais aucune étude de leur détection dans le miel n'a été publiée : Beta-lactames (pénicillines) et macrolides: tylosine, erythromycine.

Dans la routine, la présence des résidus d'antibiotiques dans le miel est testée par:

1. détermination des échantillons positifs par des méthodes de screening: tests microbiologiques, Charm II Test, ELISA ;
2. détermination quantitative pour les échantillons testés positifs par HPLC, LC-MS. **(BOGDANOV. S, 2003)**

Les sulfonamides sont liés aux sucres du miel, c'est pour cette raison qu'une hydrolyse acide est incluse dans la méthode. Après séparation par un système HPLC en phase inverse les sulfonamides sont détectés par un détecteur DAD (Diod Array Detector).

La limite de détection est aux alentours de 5ppb, celle de quantification est entre 10 et 15ppb. **(SCHWAIGER AND SCHUCH, 2000) ; (DISERENS AND PERROUD, 2002).**

La Streptomycine est analysée par un système HPLC en phase inverse suivie par une post colonne dérivatisation pour permettre la détection par fluorescence. La limite de détection est aux alentours de 5ppb, celle de quantification est de 10 ppb. **(KOCHER, 1996) ; (KLEMENTZ AND PESTERMER, 1996) ; (EDDER AND CORVI, 1998)**

Tétracycline et oxytétracycline sont détectés par un système HPLC en phase inverse avec un détecteur UV (DAD), mais la limite de détection est de 1 ppm. **(SPORNS *et al*, 1986).**

Les résidus de tétracycline sont détectés avec succès dans diverses matrices, en utilisant un système HPLC en phase inverse avec différents modes de détection comme la spectrophotométrie, la fluorescence et la spectrométrie de masse. **(OKA. H, PATTERSON.J, 1995)**

La détection en UV a une moindre sensibilité, mais la spectrométrie de masse requière une instrumentation excessivement chère. En général, la détection par fluorescence est sensible est sélective. **(IWAKI. K, OKUMURA.N, YAMAZAKI. M, 1992)**

Le chloramphénicol est détecté par un système HPLC DAD en phase inverse. L'analyse HPLC permet la quantification de différents groupes phénolique et poly phénolique parce que ces derniers possèdent un spectre Ultra-Violet (UV) caractéristique. **(KHORSANDI. K, HOSSEINZADEH. R, 2013)**

# Deuxième chapitre : optimisation des paramètres d'analyse HPLC pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le miel

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODE

### 1.1. MATÉRIELS UTILISÉS POUR LA MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE (HPLC)

#### 1.1.1. Modules HPLC

##### 1.1.1.1 Dégazeur

Modèle : DGU-20A5.prominence DEGASSER. (Réf.S/N.L20244301983CR. SHIMADZU Corporation.2006)

C'est un dégazeur en ligne qui utilise la membrane de fluoroéthylène. Il sert comme son nom l'indique à enlever les bulles d'air emprisonnées dans la phase mobile.

##### 1.1.1.2. Pompe

Deux pompes de haute pression :

- a) **Pompe1** (SOLVENT DELIVERY MODULE). Modèle: LC-10ATvp (Réf. S/N: C20974009859J2. SHIMADZU Corporation.2002)
- b) **Pompe2** (SOLVENT DELIVERY MODULE). Modèle: LC-10ATvp (Réf. S/N : C21014009440CD. SHIMADZU Corporation.2002).

Ils nous permettent de travailler soit en mode isocratique (une seule pompe sera activée pour un solvant ou un mélange constant de solvants), soit en mode gradient binaire et dans ce cas-là les deux pompes seront toutes les deux utilisées pour deux phases mobiles différentes en des temps différents, il est à noter que le mode gradient est utilisé pour la détection multi résidus.

##### 1.1.1.3. Détecteur (UV-VIS DETECTOR)

Modèle : SPD-10Avp/10AVvp (Réf. S/N: C21004001496LP. SHIMADZU Corporation.2002)

Ce détecteur est muni de deux lampes : une lampe à deutérium "D2" qui permet un balayage dans la gamme d'ondes des Ultra-violet allant de 190 à 370 nm et une autre lampe tungstène "W" qui lorsqu'elle est allumée permet un balayage dans la gamme des ondes du faisceau lumineux ordinaire (lumière visible, entre 370 à 900 nm).

#### 1.1.1.4. Système de contrôle (SYSTEM CONTROLLER)

Modèle : SCL-10Avp. (Réf. S/N : C21014009440CD. SHIMADZU Corporation.2002)

Il commande directement tous les autres modules de la série AT10-VP, son menu d'affichage est simplifié. Et il est relié à un ordinateur.

#### 1.1.1.5. Boucle a injection pour HPLC.

SHIMADZU 2E, Rheodyne. D'une capacité de 20 µl (Lot ID: 1302.SHIMADZU Corporation.2002)

#### 1.1.1.6. Reservoirs

- Réservoirs pour phase mobile.
- Réservoir pour contenir les déchets.

#### 1.1.1.7. Pré Colonne

SHIMADZU Cardrige, 102LX4.6mm. (SHIMADZU Corporation.2002)

#### 1.1.1.8. Colonne

Shim Pack Colonne C18 en phase inverse, de type VP-ODS, 250L X 4.6 (S/N : 2032680.SUPELCOSIL, 2002), c'est une colonne remplie de gel de silice greffé par des groupements Alkyles pour inverser la polarité.

### 1.1.2. **Supports informatiques**

- a) **Ordinateur**: de type Hewlett Packard (**hp**). Processeur : Intel Pentium (4), System d'exploitation : Windows 2000, supportant un logiciel pilote de traitement de données des modules HPLC (Chromatography WorkstationCLASS-VP. Release 6.12 SP1. (SHIMADZU CORPORATION. P/N 22305225C). Il nous permet de manipuler et d'analyser d'une manière très aisée les graphes obtenus. Ce logiciel comporte une interface graphique qui nous permet de configurer les paramètres d'analyse avec lesquels quels on doit travailler à savoir le débit, la pression des deux pompes, la longueur d'onde, le temps d'analyse, le mode d'analyse (isocratique ou bien gradient binaire).
- b) **Imprimante** :
  - Hewlett Packard. **Hp DeskJet 920c**. (Réf. C6430A)
- c) **Logiciels de calculs statistiques** :
  - Microsoft Excel Professional (Microsoft corporation. 2003)
  - Statgraphics centurion VX.II (Statpoint, Inc. 2007).

### **1.1.3. DISPOSITIF DE FILTRATION (SUPELCO.Cat.58061 & 58062U)**

#### **a) Parties de la Cat.No.58061**

- réservoir en verre, 250ml. (Réf.58063)
- Funnel base and stoppers. (Réf.58064)

#### **b) Parties de la Cat.No.58062U**

- flacon conique sB4/45, 1000ml. (Réf.58070U)
- clamp. (Réf.58053)
- tamis en acier inoxydable. (Réf.58065)
- Joint en Téflon, pk. Of 10. (Réf.58066)
- 66 membranes en Nylon, 47mmX0.45µm pores, pk.of50. (Réf.58067)
- Pompe à vide.

Tous les éluants et solutions utilisés dans l'analyse HPLC doivent passer par ce dispositif. L'emploi de ce dernier nous permet d'éliminer les impuretés ainsi que les bulles d'air ce qui permet de prévenir l'apparition d'artefacts dans les pics.

### **1.1.4. Petits matériels**

- Seringue d'injection pour boucle HPLC. Syringe Perfection. (SGE. Réf. C 670-12554-03)
- pipettes : 0.5, 1, 2,5, 10 et 20ml.
- micropipettes : 10, 20,50 et 100µl.
- macropipettes : 10ml
- flacon a vis pour échantillonnage, 40ml.
- spatules en acier inoxydable
- pissettes, 100ml
- gants en latex
- masques (bouches et nez)

### **1.1.5. Produits chimiques et standards**

#### **1.1.5.1. Produits chimiques**

- Acetonitrile pour HPLC (Réf. Lot 6235A.SIGMA-ALDRICH)
- Methanol pour HPLC (Réf. Lot 5363C.SIGMA-ALDRICH)
- Acide trichloracétique puriss phe (Réf. Lot 12320. Riedel de Haen)

- Acide acétique cristallisable, 100% p.a (Réf. Lot A1002AA. ORGANICS)
- Acide oxalique dehydrate purum 99 %( Réf. Lot 1100338 21605218.FLUKA. SIGMA-ALDRICH)
- Acide formique purum 99 %( Réf. Lot 1181464 42105354.FLUKA. SIGMA-ALDRICH)
- Sodium Sulfate anhydre granule (Réf. Lot 375305/133805243.FLUKA. SIGMA-ALDRICH)
- N-hexane pour la chromatographie en phase liquide Chromasol. Chromanorm for HPLC. (Réf. 24575.290. VWR. BDH. PROLABO)
- Eau pour la chromatographie. Water, CHROMASOLV plus, for HPLC Réf. Lot 34877.SIGMA-ALDRICH)
- Acetone pour la chromatographie en phase liquide. Chromanorm for HPLC. (Réf. 20067.290. VWR. BDH. PROLABO)

#### 1.1.5.2. Standards

##### a) Standards PHYWE

Mélange de quatre molécules dérivées d'hydrocarbure avec des concentrations bien définies et équilibrées :

- Anthracène.
- Tétracène.
- Acénaphène.
- Acénaphylène.

##### b) Standards antibiotiques (Cf. annexe N°1)

#### **Streptomycine solution, 10ml. (Réf. 85886. SIGMA-ALDRICH)**

Les Caractéristiques du standard streptomycine sont :

- Firme : BioChemika (Filiale de SIGMA-ALDRICH)
- Streptomycin solution
- concentration 1 mg/mL in 1 mM EDTA
- Molecular Formula :  $C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$
- Molecular Weight 728.69 g/mol

#### **Chloramphenicol VETERANAL, 250 mg. (Réf. 46110. SIGMA-ALDRICH)**

- Molecular Formula :  $Cl_2CHCONHCH(CH_2OH)CH(OH)C_6H_4NO_2$
- Molecular Weight : 323.13g/mol

## **Oxytetracyclin Hydrochloride VETERENAL (Réf. 46598. SIGMA-ALDRICH)**

- Firme : Riedel-de Haen (Filiale de SIGMA-ALDRICH)
- Molecular Formula : C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>CLN<sub>2</sub>O<sub>9</sub>
- Molecular Weight 496. 9 g/mol

### **1.2. PROTOCOLE GÉNÉRAL D'ANALYSE**

#### **1.2.1. Procédure générale d'analyse HPLC**

##### 1.2.1.1. Filtration de la phase mobile

Cette dernière est considérée comme une étape primordiale de l'analyse, vu qu'elle permet l'élimination de la poussière et les bulles d'air pouvant contaminer la phase mobile ou les échantillons à analyser.

Elle s'effectue grâce à une pompe à vide qui aspire le liquide (phase mobile, échantillons) d'une façon active par le biais de la pression exercée par cette dernière. L'air aspiré permet le passage du liquide à travers un filtre possédant des pores d'un diamètre de 0,5 µm, qui ne permet que le passage de la phase mobile tout en retenant les particules indésirables.

##### 1.2.1.2. Mise en marche des modules HPLC

Tout le système est alimenté par une source de courant alternatif (AC/ 210-230Volt/50A), reliée à un stabilisateur qui a pour but de régler les variations d'intensité électriques provoquant des influences indésirables sur le bon fonctionnement du système.

La mise en marche des modules HPLC, doit respecter impérativement un ordre chronologique bien défini pour un fonctionnement optimal et qui est le suivant :

- allumage du dégazeur.
- Allumage de la pompe (A).
- Allumage de la pompe (B).
- Allumage du détecteur.
- Mise en marche de l'enregistreur.

L'ensemble est connecté à un ordinateur sur lequel est installé le programme pilote (Class-Vp Workstation 6.1.) qui peut contrôler tous les modules, il sera démarré en dernier lieu.

**NB** : il est à noter qu'après l'allumage du module de détection, il faut attendre que l'appareil effectue deux opérations automatiques très importantes, qui sont les suivantes :

- sélection de la lampe utilisée lors de l'analyse (lampe à VIS ou lampe à UV).
- cette dernière sélectionnée, il faut généralement une minute pour son préchauffage.

#### 1.2.1.3. Purge

La purge est une manœuvre très indispensable avant toute analyse, vu qu'elle permet l'élimination des bulles d'air ou les particules de poussière qui peuvent se trouver dans les tuyaux et les deux pompes. Le passage de ces éléments dans la colonne lors de l'analyse sera enregistré comme des artéfacts sur la ligne de base du chromatogramme et risque de déformer le pic de la molécule à analyser.

L'opération se déroule comme suit :

- Remplissage du ou des réservoirs par la phase mobile filtrée au préalable (dans notre cas on utilise généralement le Méthanol, comme on peut utiliser l'Acétonitrile ou l'eau bi distillée).
- Chaque pompe est munie d'une valve qui assure le contrôle manuel de la pression au sein de ces dernières, faire subir à ces valves une rotation de 180° dans le sens des aiguilles d'une montre, entraînera une baisse brutale de la pression à l'intérieur des pompes. La phase mobile sera confectionnée dans les pompes qui tournent avec un régime basse pression, nettoyant de la sorte ces dernières tout en court-circuitant les autres modules (détecteur et enregistreur).
- Après l'ouverture des valves, on peut actionner les pompes manuellement à partir de la touche « purge » se trouvant sur le tableau de commande des deux pompes ou automatiquement par le logiciel pilote (Class-Vp Workstation.6.1).
- La phase mobile à l'intérieur des pompes sera éliminée par le biais d'un tuyau relié à chacune d'entre elles se terminant dans un réservoir destiné à recevoir la phase mobile issue de la purge.

- L'opération ne dure en moyenne pas plus de trois minutes, temps largement suffisant pour le nettoyage des pompes. Après cela, les pompes s'arrêtent automatiquement et on procède à la fermeture des valves.

#### 1.2.1.4. Filtration

Cette opération précède toute analyse par notre système HPLC, elle a pour but l'élimination des bulles d'air grâce à la pompe de filtration (pompe à vide) est stoppé toute particule (poussière surtout) susceptible d'interférer avec les pics attendus. Tout éluant ou analyte doivent subir cette filtration systématiquement.

#### 1.2.1.5. Mode opératoire

Après filtration de la phase mobile, cette dernière est mise dans des réservoirs (flacons en verre spéciaux). L'analyse des échantillons passe toujours par l'ensemble des opérations suivantes :

##### **a) Création de la méthode d'analyse**

Cette opération nous permet de définir les paramètres de l'analyse avec lesquels nous désirons travailler et comprend les étapes suivantes :

- les pompes : il faut préciser le débit, la pression maximale ainsi que le mode de fonctionnement des pompes (isocratique ou mode gradient) : pour notre étude, nous avons opté pour le mode isocratique car l'analyse nécessite l'utilisation d'une seule phase mobile.
- le détecteur : la présence de deux canaux de détection nous a permis d'utiliser deux longueurs d'onde différentes ce qui nous a facilité l'optimisation du paramètre longueur d'onde.
- il faut ensuite limiter le temps de l'analyse.
- le tout est enfin sauvegardé sous un nom propre à la méthode.

##### **b) Lancement de l'analyse**

Cette opération fait démarrer les pompes automatiquement, il faut ensuite attendre que la pression des pompes se stabilise, ensuite nous injectons l'analyte par une seringue spéciale dans la boucle d'injection qui assure deux fonctions : le mélange de l'analyte et la phase mobile et faire parvenir ce mélange jusqu'à la colonne où s'effectue la séparation des différents composants.

Comme la phase mobile est choisie en fonction de sa polarité (en phase inverse la phase mobile est polaire alors que la phase stationnaire est apolaire), cela implique que le premier élément à sortir de la colonne et à être détecté est la phase mobile qui représente la ligne de base de notre chromatogramme, ensuite chaque élément sort selon son affinité pour la phase stationnaire ce qui représente le temps de rétention dans la colonne

Le faisceau lumineux traversant le détecteur est capté par la cellule photoélectrique qui le transforme en signal électrique qui est intégré par le système de contrôle.

Le chromatogramme obtenu est enregistré et sauvegardé dans un fichier géré par le logiciel Class-VP.

### **1.2.2. Étalonage du système HPLC**

Pour cette étape, notre travail a consisté à vérifier la fiabilité du Système HPLC et son bon fonctionnement, en d'autres termes à tester sa capacité à effectuer des analyses conformes à nos objectifs fixés.

Toutes les opérations ont été menées par nos soins sous la supervision d'un ingénieur spécialiste dans la certification des systèmes HPLC.

Dans ces essais nous avons respecté toutes les procédures générales d'analyse sus mentionnées (*cf. procédure générale d'analyse*), tout en adaptant les paramètres d'analyses propres au standard utilisé, ce dernier est un mélange de quatre Molécules dérivées d'hydrocarbures extra pures, préparées et certifiées au préalable pour l'analyse HPLC : anthracène, Tétracène, acénaphthène et enfin l'acénaphthylène.

Concernant les paramètres de l'analyse pour ces standards, nous avons utilisé ceux préconisés par le fabricant :

- une phase mobile composée à 100% par du Méthanol (MeOH).
- Un débit pour les pompes de 1.5 ml/min.
- Une longueur d'onde dans la gamme ultra-violette (UV), de 254 nanomètres (nm) pour le détecteur (A1) et de l'ordre de 270 (nm) pour le détecteur (A2).
- Un temps d'analyse de 08 minutes.
- Un volume du standard injecté égal à 02µl.

Ces paramètres d'analyse fixés, ils seront adoptés pour toutes les séries d'analyses effectuées par la suite pour ce qui est de l'étalonnage de l'appareil.

### **1.2.3. Optimisation des paramètres de l'analyse HPLC**

Il est nécessaire avant de valider une méthode d'optimiser les conditions d'analyse, en faisant varier le débit, la température, en modifiant la nature ainsi que la concentration de l'éluant, en optimisant le choix de la colonne. On peut ainsi minimiser le temps de l'analyse, fixé par le temps du dernier composé élué, tout en préservant une bonne résolution pour que la méthode reste spécifique, c'est-à-dire qu'elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt.

L'optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques a porté sur trois molécules standards : la streptomycine, le chloramphénicol et l'oxytétracycline.

Nos travaux ont consisté à optimiser les paramètres d'analyse HPLC suivants :

- La phase mobile,
- La phase stationnaire,
- La longueur d'onde,
- Le débit,
- Le temps d'analyse,
- Le volume injecté,
- La concentration des échantillons injectés.

**NB :** Les travaux de l'optimisation des paramètres d'analyse HPLC ont été effectués dans une étude antérieure réalisée dans le cadre d'un travail de magister soutenu publiquement en 2009. Dans cette étude nous nous contentons que d'exposer les résultats obtenus seulement.

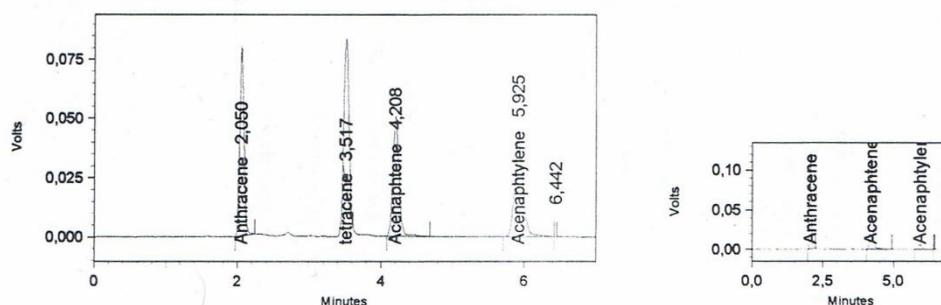
## **2. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **2.1. ÉTALONNAGE DU SYSTÈME HPLC**

L'objectif été de vérifier si notre système d'analyse arrive à nous donner des résultats fiables et reproductibles avec un mélange de standards purs avec des concentrations bien définies, dans ce but nous avons effectué une centaine d'essais sous la direction d'un ingénieur qualifié pour tester la fiabilité de notre système HPLC.

La figure N°6 représente le chromatogramme enregistré par le canal (A1) du détecteur paramétré à une longueur d'onde de 254nm. Le chromatogramme affiche quatre pics avec un niveau de séparation bien distinct et très fin avec une ligne de base stable. On constate aussi que le temps

d'enregistrement des pics qui correspond au temps de rétention de la molécule par la phase stationnaire (la colonne) qui est différée dans le temps, car la composition chimique de chaque composant du standard, qui fait que l'interaction avec la colonne ne soit pas la même.



Detector A - 1  
(254nm)

Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Height Percent
Anthracene	2,050	326928	26,48	79983	34,55
tetracene	3,517	258196	20,91	61797	26,69
Acenaphthene	4,208	314202	25,45	50418	21,78
Acenaphthylene	5,925	335197	27,15	39323	16,98
<b>Totals</b>		1234523	100,00	231521	100,00

Detector A - 2  
(270nm)

Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Height Percent
Anthracene	2,050	481014	38,11	118976	49,64
Acenaphthene	4,208	726211	57,54	114239	47,67
Acenaphthylene	5,925	54902	4,35	6444	2,69
<b>Totals</b>		1262127	100,00	239659	100,00

Figure N° 6: chromatogramme de l'analyse du standard PHYWE avec les paramètres optimisés

Chaque pic correspond à une molécule du standard dans l'ordre suivant :

- pic d'Anthracène enregistré à 2.050 minutes, avec une surface de pic égale à 711,780 points et un pourcentage couverture de 26.03%
- pic de Tétracène enregistré à 3.517 min, d'une surface de 568,024 points (21.50%)
- pic d'Acénaphthène enregistré à 4.200 min, couvrant une surface de 693,200 points proportionnels à un pourcentage de 25.35%.

d) pic d'Acénaphthylène enregistré à 5.933 min. pour une surface de 741,219 points avec un pourcentage de 27.11%. (cf. annexe)

On note que les surfaces couvertes par les quatre pics correspondants aux molécules du standard sont très proches, ainsi que leurs pourcentages respectifs, ce qui signifie que le mélange est assez équilibré vis-à-vis de sa concentration et de sa nature.

Le deuxième chromatogramme de la figure N°6, a été enregistré par le détecteur A2, paramétré à une longueur d'onde de 270nm, les pics observés correspondent aux :

a) Pic d'anthracène enregistré à un temps de 2.050minutes avec une surface de 1, 053,252 points (38.51%),

b) pic d'Acénaphthène apparu à 4.200 minutes, couvrant une surface de 1, 558, 642 points (57.03%),

c) pic d'acénaphthylène a 5.933 minutes, couvrant une surface de 122,082 points (4.46% du total de la surface intégrée). (Voir annexe02)

La première constatation, c'est que les temps de rétention des molécules analysées n'ont pas varié avec le changement de la longueur d'onde, par contre les surfaces que couvre chacun des pics ont changé considérablement ainsi :

a) Pour l'anthracène, la surface enregistrée à 254 nm été de 711,780 points contre 1, 053,252 points à la longueur d'onde de 270nm, avec une augmentation de la surface moyenne du pic égale à 341, 472 points **(32, 58% de surface en plus)** ;

b) Pour le Tétracène, la surface enregistrée à 254 nm été de 568,024 points contre 0 point enregistré à la longueur d'onde de 270nm, avec une diminution de 100 % de la surface détectée, ce qui implique une détection nulle à cette longueur d'onde **(de 100% à 0% de surface)** ;

c) Pour l'Acénaphthène, la surface enregistrée à 254 nm été de 693,200 points contre 1, 558, 642 points à la longueur d'onde de 270nm, l'augmentation de la surface du pic équivaut à 865, 642 points **(55,5% de surface en plus)** ;

d) Pour l'acénaphthylène la surface enregistrée à 254 nm été de 741,219 points contre 122,082 points à la longueur d'onde de 270nm, la diminution de la surface est égale à 619, 137 points **(83,5% de surface en moins)**.

Les variations notables des surfaces des pics démontrent dans un premier lieu l'influence de la longueur d'onde sur la détection et la quantification dans un système HPLC, en fait chaque molécule possède une longueur d'onde optimale qui est fonction de sa structure chimique.

En vue de ces résultats, le paramètre longueur d'onde est traité en premier lors de l'étape d'optimisation des paramètres d'Analyse HPLC.

## CONCLUSION

Cette étape qui est l'étalonnage nous a permis de conclure que notre système HPLC en phase inverse est capable de détecter et de quantifier plusieurs résidus en une seule analyse ce qui permet une analyse multi résidus si toutes les conditions sont réunies.

Le choix du paramètre longueur d'onde est crucial dans une analyse HPLC

## 2.2. OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES PAR HPLC

### 2.2.1. Paramètres retenus pour l'analyse HPLC de la streptomycine

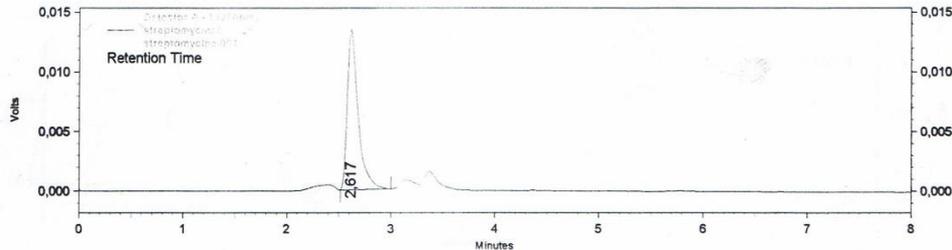
Après les essais sur l'optimisation, nous avons retenu les paramètres suivants pour l'analyse HPLC de la streptomycine (voir tableau N° 6) :

Tableau N° -6- : paramètres retenus pour l'analyse HPLC de la streptomycine

Paramètres d'analyse	Valeurs retenues
Longueur d'onde	Détecteur A1 : 250 Détecteur A2 : 280
Phase mobile	méthanol
Phase stationnaire	Colonne en phase inverse C18
débit	1.2 ml / min
concentration	1µg / ml
Volume injecté	10 µl

La figure N° 7, représente le chromatogramme obtenu avec les paramètres optimisés

Method Name: D:\ATB\streptomycine1\streptoreprod\streptoreprod\streptoreprod.met  
Data Name: D:\ATB\streptomycine1\streptoreprodserie8\streptomycine 001  
User: System  
Acquired: 06/02/2008 14:16:24  
Printed: 19/11/2008 11:41:05



Detector A - 1 (250nm)					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	2,617	97628	100,000	13556	100,000
Totals		97628	100,000	13556	100,000

Figure N° 7 : chromatogramme de l'analyse du standard streptomycine avec les paramètres optimisés

#### 2.2.1.1. Longueur d'onde

D'après les essais effectués pour optimiser la longueur d'onde, nous constatons que le standard streptomycine a une absorption optimale à 250 nm, c'est la raison pour laquelle nous avons gardé cette dernière pour la suite de notre expérimentation.

En théorie nous remarquons que la streptomycine peut être recherchée dans un spectre d'absorption qui s'étale de 210 à 325 nm.

**VINAS. P et al, (2007)**, ont travaillé avec une longueur de 356 nm, **CINQUINA. À et al (2003)** ont travaillé avec une longueur d'onde de 277 nm (proche de la longueur d'onde avec laquelle nous avons travaillé), **MOROVJAN. G et al (1998)**, ont travaillé avec une longueur de 220 nm. On constate que différentes longueurs d'onde ont été utilisées par différents auteurs cela est certainement dû à la nature du matériel utilisé pour chaque analyse.

#### 2.2.1.2. Phase mobile

Pour la phase mobile, nous avons retenu le méthanol qui a une bonne transmittance dans la gamme ultraviolette (UV) et une faible viscosité, ce qui justifie son utilisation pour ce type de séparation chromatographique (**VINAS. P et al, 2007**).

**VINAS. P et al (2007)**, ont utilisés pour la séparation de la streptomycine et la dihydrostreptomycine, une phase mobile en mode isocratique, dans les proportions 94:6 (v/v), 94% eau pour HPLC additionné de 10mM sodium pentanesulfonate (pH 3.3) : 06% méthanol.

#### 2.2.1.3. Phase stationnaire

Pour ce qui est de la phase stationnaire, nous avons utilisés une colonne VP-ODS C18 en phase inverse, avec des dimensions de 250mmx 4.6 prémunie d'une cartouche (102mmx4.6), faisant état de pré colonne. Ce type de colonne est très adéquat pour l'analyse de la streptomycine, qui est une molécule dotée d'une très grande polarité, donc l'interaction avec la colonne en phase inverse qui est en fait non polaire sera amplifier.

La moyenne de taille des colonnes est située entre 100 et 300 mm de longueur et un diamètre interne de 4.6 mm Les meilleures colonnes utilisées en phase inverse sont celles greffées par des chaines carbonés (C8 ou C18). (**MERKEN & BEECHER, 2000**)

#### 2.2.1.4. Débit

Le débit correspond au volume de la phase mobile circulant au travers de la colonne chromatographique par unité de temps ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ )

Nous avons remarqué que le débit avec lequel progressent la phase mobile et l'analyse agit sur le temps d'apparition des pics ; l'augmentation du débit diminue le temps d'apparition et vice-versa ainsi, nous avons constaté que le débit n'agit que sur le temps d'apparition des pics tandis que les surfaces des pics ne subissaient pas des variations significatives, donc nous avons gardé le débit de 1.2 ml/min pour la suite de notre travail.

**BENETTI. C et al, (2004)** ont travaillé également avec un débit de 1ml/min avec un temps d'apparition des pics de streptomycine de 4.8 min légèrement différent par rapport à notre résultat.

#### 2.2.1.5. Volume injecté

En ce qui concerne le paramètre volume injecté, Selon **CINQUINA. À et al (2003)**, l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé, effectivement dans notre cas nous avons remarqué que le volume d'injection agit sur l'amplitude des pics (la surface) et non sur le temps d'apparition, ainsi la surface obtenue avec un volume de 10  $\mu\text{l}$  à pratiquement augmenté de presque 33% avec le volume de 15  $\mu\text{l}$ . Pour la suite de notre travail, nous avons gardé le volume de 15 $\mu\text{l}$

**VINAS. P et al (2007)**, ont utilisé un volume d'injection de 10  $\mu\text{l}$ , **BENETTI. C et al (2004)**, ont utilisé un volume de 100  $\mu\text{l}$ , mais dans la plupart des publications les surfaces correspondantes aux volumes ne sont pas signalées cela est en relation directe avec la capacité de la boucle d'injection et la longueur de la colonne qui déterminent en général le volume injecté lors des analyses HPLC.

#### 2.2.1.6. Concentration

Selon **VINAS. P et al, (2007)**, des concentrations élevées d'échantillons de streptomycine nécessite un temps d'analyse très long, dépassant les 20 minutes, tandis que nous avons obtenu de très bons chromatogrammes avec le temps d'analyse de 08 minutes et une concentration de 01µg/ml du standard streptomycine.

#### 2.2.2. Paramètres retenus pour l'analyse HPLC du chloramphénicol

Après les essais sur l'optimisation, nous avons retenu les paramètres suivants pour l'analyse HPLC du Chloramphénicol (voir tableau N° 7) :

**Tableau N° 7 : paramètres retenus pour l'analyse HPLC du chloramphénicol**

Paramètres d'analyse	Valeurs retenues
Solution de dilution	Méthanol
Longueur d'onde	Détecteur A1 : 272 Détecteur A2 : 290
Phase mobile	Acetonitrile
Phase stationnaire	Colonne en phase inverse C18
débit	1.2 ml / min
concentration	0,2mg / ml
Volume injecté	10 µl

La figure N° 8, représente le chromatogramme obtenu avec les paramètres optimisés :

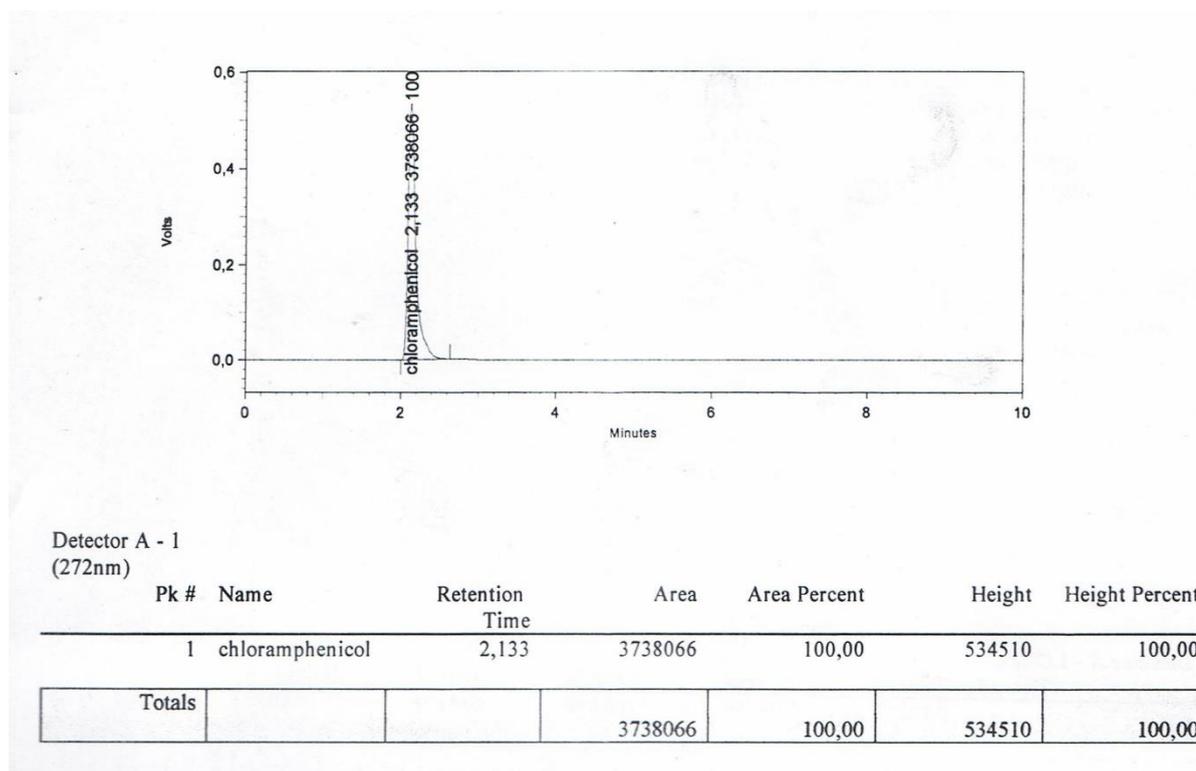


Figure N° 8 : chromatogramme de l'analyse du standard chloramphénicol avec les paramètres optimisés

#### 2.2.2.1. Solution de dilution du standard

Le choix de la solution de dilution repose sur le principe de la non-interférence entre cette dernière et l'analyte. La transmittance du méthanol est maximale (98%) entre 260 et 400 nm, pour la suite du travail nous avons gardé le méthanol comme solution de dilution du standard chloramphénicol.

**LINLING *Et Al* (2008)**, **PAN *et al* (2006)** et **ORTELLI *et al* (2004)** ont utilisé le méthanol pour la préparation des échantillons, **NICOLICH *et al* (2006)** ont quant à eux utilisé un mélange de 50% méthanol et 50% eau pour la préparation du standard.

#### 2.2.2.2. Phase mobile

Pour la phase mobile, nous avons retenu l'acétonitrile qui a une bonne transmittance dans la gamme ultraviolette (UV) (99% à 255) et une faible viscosité, ce qui justifie son utilisation pour ce type de séparation chromatographique (**VINAS. *P et al*, 2007**).

#### 2.2.2.3. Phase stationnaire

Pour ce qui est de la phase stationnaire, nous avons utilisé une colonne VP-ODS C18 en phase inverse, avec des dimensions de 250mmx 4.6 prémunie d'une cartouche (102mmx4.6), faisant état de précolonne. La chromatographie en phase inverse est la méthode d'analyse la plus utilisée pour les composés phénoliques (**LEE. H. S, 2000**).

La moyenne de taille des colonnes est située entre 100 et 300 mm de longueur et un diamètre interne de 4.6 mm. Les meilleures colonnes utilisées en phase inverse sont celles greffées par des chaînes carbonées (C8 ou C18). (**MERKEN & BEECHER, 2000**)

#### 2.2.2.4. Longueur d'onde

Nous avons testé plusieurs longueurs d'onde dans une gamme de longueurs d'onde allant de 200 à 320 nm. Nous avons gardé 272 nm pour la suite de notre travail. **PAN et al (2006)** ont utilisé 278 nm comme longueur d'onde, **LINLING et al (2008)** ont travaillé avec 270 nm.

#### 2.2.2.5. Débit des pompes

**PAN et al (2006)** ont travaillé avec un débit de 1 ml/min et le temps d'apparition du pic se situe à 3 min (très proche de notre temps d'apparition avec le même débit). Par contre **LINLING et al (2008)** ont travaillé également avec 1 ml/min, mais le temps d'apparition est de 10.7 min cette différence vient probablement de la phase mobile qui est différente. D'autre part, **NICOLICH et al (2006)** ; **GUY et al (2004)**, ont travaillé avec un débit de 0.3 ml/min et ont des temps d'apparitions respectivement de 7.5, 8.1 et 7.93 min.

#### 2.2.2.6. Volume d'injection

Comme pour la streptomycine, nous constatons que le volume agit sur la grandeur des surfaces, plus le volume augmente et plus les surfaces augmentent aussi, ainsi la surface obtenue avec le volume de 20 µl représente le double par rapport à celle obtenue avec un volume de 10 µl et la surface de ce dernier représente le double par rapport à celle obtenue avec un volume de 5 µl, pour la suite du travail nous avons gardé le volume de 10 µl

**PAN et al (2006)** ont utilisé un volume de 10 µl, **ORTELLI et al (2004)** ont utilisé 10 µl, **LINLING et al (2008)** ont utilisé un volume de 20 µl et **GUY et al (2004)** ont travaillé avec un volume de 15 µl.

### 2.2.3. Paramètres retenus pour l'analyse HPLC de l'oxytétracycline

Après les essais sur l'optimisation, nous avons retenu les paramètres suivants pour l'analyse HPLC de l'oxytétracycline (voir tableau N° 8) :

Tableau N° 8 : paramètres retenus pour l'analyse HPLC de l'oxytétracycline

Paramètres	Valeurs retenues
longueur d'onde	Détecteur A1 : 325nm Détecteur A2 : 344 nm
Solution de dilution	Méthanol
phase stationnaire	VP-ODS phase inverse (C18)
phase mobile	Acétonitrile
débit	1.5 ml/min
volume injecté	10 µl
Concentration	0,4 mg/ml
durée d'analyse	8 minutes

La figure N° 9, représente le chromatogramme obtenu avec les paramètres optimisés :

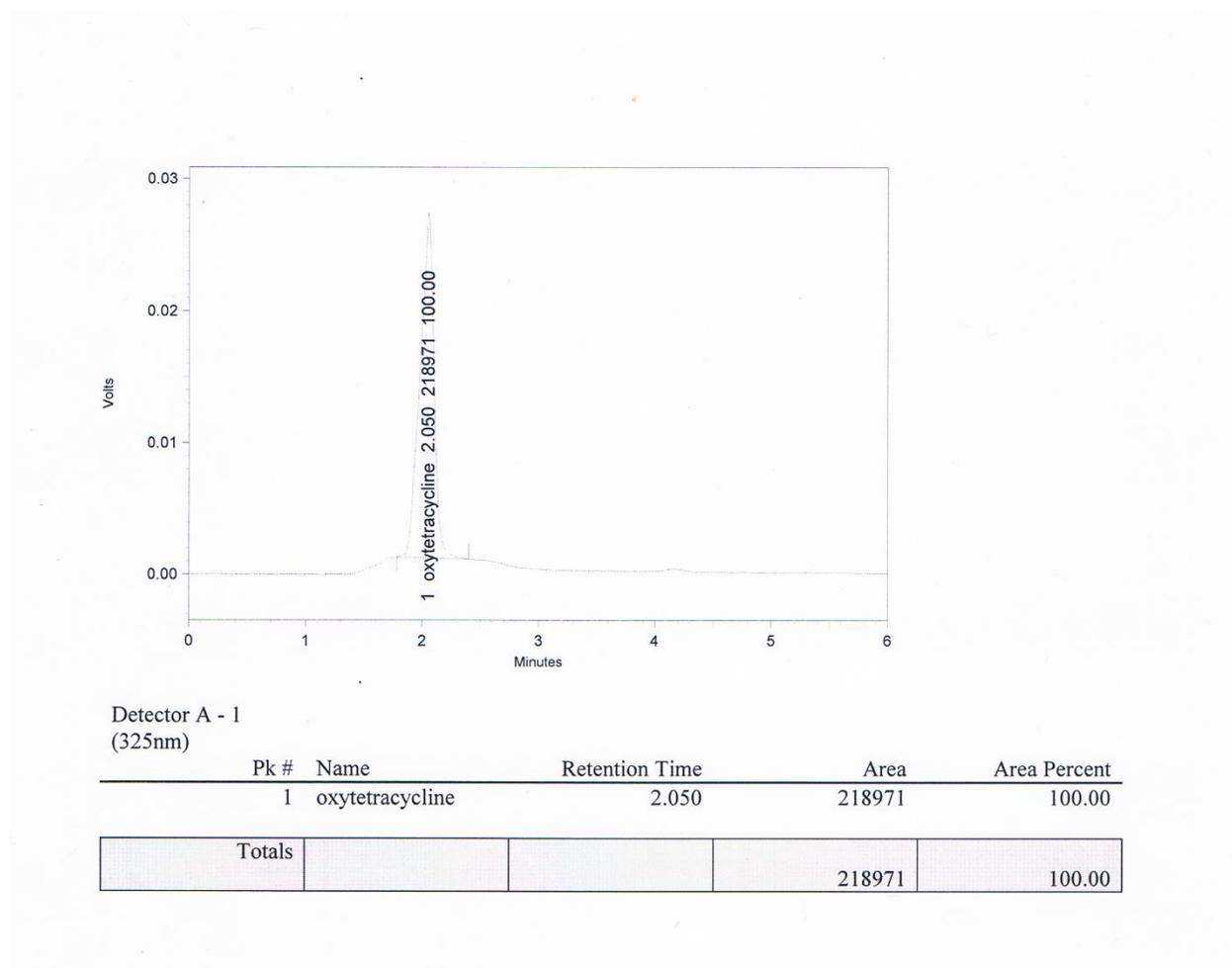


Figure N° 9 : chromatogramme de l'analyse du standard oxytétracycline avec les paramètres optimisés

#### 2.2.3.1. Phase stationnaire

Nous avons utilisé une seule phase stationnaire en phase inverse, de type VP-ODS.C18. En réalité ce paramètre n'a été pas optimisé, mais plutôt choisie par rapport à des données bibliographiques qui indiquent que la séparation de l'oxytétracycline est meilleure dans une colonne en phase inverse.

En 2003, **FURUSAWA**, utilise une colonne analytique en phase inverse qui est la C18 comme phase stationnaire. **GOMEZ-JIMENEZ et al (2008)** ont utilisés durant la séparation chromatographique deux spécialités de colonne analytique en phase inverse : la Supelco C18 nucleosil column (5 m, 150×4.6 mm I.D.) et la C18 guard column (5 m, 30×4.6 mm I.D). **SCHNEIDER et al**, ont aussi utilisé en **2007** une colonne analytique en phase inverse spécialité ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl chromatography column (3.0mm×150 mm, 3.5 $\mu$ , Agilent, Palo Alto, CA, USA).

#### 2.2.3.2. Phase mobile

Le mode d'élution isocratique a été adopté. Une seule phase mobile a été retenue, il s'agit de l'acétonitrile. Utilisé par **WANG et al** en 2004, ce groupe d'auteurs préconise une phase mobile composée d'acétonitrile, mais mélangée à du méthanol. La même phase mobile a été utilisée en **2003** par **CINQUINA et al**, et en **2004** par **REED et al**. En **2008**, **HU et al** ont utilisé une phase mobile très différente de celle que nous avons utilisée, il s'agit du méthanol.

#### 2.2.3.3. Longueur d'onde

Une plage de différentes longueurs d'onde allant de 200 à 370 nm ont été testées. Deux longueurs d'onde ont été retenues pour détecter et quantifier l'oxytétracycline : 325 nm et 344 nm.

Ces longueurs d'onde nous ont permis d'obtenir des pics avec le maximum de surfaces recouvertes. Nos résultats pour ce paramètre sont proches de ceux obtenus par **FURUSAWA** dans ses travaux réalisés en **2003**, a utilisé deux longueurs d'onde différentes : 357 nm et la deuxième 268 nm. **COYNE et al** utilisent en **2004** une longueur d'onde (353 nm) encore plus proche de la deuxième longueur que nous avons retenue (344 nm). La longueur d'onde que **REED et al** ont utilisée en **2004** est de 350 nm.

#### 2.2.3.4. Débit

Le débit a été maintenu à 1.5 ml/min. D'après les essais que nous avons effectués, nous avons remarqué que le débit n'a pas une grande influence, il agit surtout sur le

temps de rétention, temps pendant lequel la molécule à doser est retenue dans la colonne analytique et par conséquent sur le temps d'apparition du pic. Ce débit est différent de celui qui a été utilisé dans d'autres travaux, ainsi **WANG et al (2004)** ; **CINQUINA et al(2004)**, ont utilisé un débit de l'ordre de 1ml/min. Cependant **REED et al (2004)** ont utilisé un débit de 1.2 ml/min, proche du débit que nous avons retenu.

#### 2.2.3.5. Volume injecté

Ce paramètre de Volume injecté a été optimisé par rapport à la capacité de la boucle d'échantillonnage qui est munie d'une capacité maximale de 20 µl seulement. L'effet de ce paramètre se résume en une diminution ou en une augmentation de l'aire du pic selon la quantité du volume injecté. Plus on augmente la quantité injectée plus la surface de l'aire du pic augmente et vice-versa. Le volume injecté que **HU et al**, ont utilisé en **2008** est très proche du volume que nous avons retenu, ils ont choisi un volume injecté de 10 µl **BABI et al** utilisent en **2006** un volume injecté de 20 µl.

## Troisième chapitre : validation de la méthode d'analyse HPLC

### 1. PROCÉDURE DE VALIDATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC

La validation d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la Limite de Détection d'une Méthode (LDM), la Limite de Quantification d'une Méthode (LQM), la Limite de Linéarité (LL), la Fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la Justesse, la Sensibilité, et finalement, la récupération (voir tableau N°9). Quelques paramètres de la validation peuvent ne pas s'appliquer à certaines méthodes. **(CEAEQ, 2015); (ICH, 2005); (PETITJEAN. P, 2001); (DIRECTIVE DU CONSEIL 75/318/CEE, 1975); (ACCORDING TO ISO 3534-1 AND ISO 5725-1 STANDARDS); (USP33-NF28, 1990).**

L'annexe N°3 illustre les formules de calcul qui sont utilisées pour la détermination des différents paramètres de la validation d'une méthode d'analyse.

Tableau N° 9 : Critères de validation d'une méthode analytique (PETITJEAN. P, 2001)

Niveau	Critère
<i>Identification</i>	Spécificité
<i>Essai (teneur en impureté)</i>	Spécificité Seuil de détection ou seuil de quantification
<i>Dosage (teneur ou activité)</i>	Spécificité Linéarité Justesse Fidélité : - répétabilité - reproductibilité Seuil de quantification (Robustesse)

## **1.1. FIDÉLITÉ**

### **1.1.1. La répétabilité**

La *fidélité* représente l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants effectués sur différentes prises d'essais d'un même échantillon homogène. De façon plus précise, la *répétabilité* – qui est un terme équivalent – représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus avec la même méthode, sur un même échantillon homogène, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même matériel et dans un court intervalle de temps. (DUCAUZE. C, 2016) ; (MARCHAND. M, 2013) ; (CEAEQ, 2015)

La fidélité est généralement exprimée par le pourcentage de coefficient de variation (CV). (MAYOR. M, 2010). La formule classique est : (voir annexe N°3. Deuxième partie)

Nous avons évalué la Répétabilité de la méthode par une série de dix essais effectués le même jour, par un seul analyste sur une solution constituée de méthanol (20ml) supplémenté du standard antibiotique streptomycine (20µg) pour obtenir la concentration de 1µg /ml.

La solution du standard chloramphénicol a été préparé en diluant 02mg dans 10 ml de méthanol pour obtenir une concentration de 0.2mg/ml.

Pour l'analyse du standard oxytétracycline nous avons mélangé 4mg (standard pur) avec 10 ml de méthanol afin d'obtenir une solution d'une concentration de 0.4 mg/ml.

Pour la vérification de la Répétabilité, nous avons utilisé les paramètres d'analyse optimisés et adoptés à nos conditions d'analyse (cf. optimisation des paramètres de détection et de quantification)

Les résultats seront exprimés par :

- a) la déviation standard de Répétabilité (écart type).
- b) Le coefficient de variation de Répétabilité (déviation standard relative).
- c) L'intervalle de confiance de la valeur moyenne. (avec un seuil de 05%)

### **1.1.2. Précision intermédiaire (fidélité intermédiaire)**

La reproductibilité qui, à la différence de la répétabilité, considère les résultats obtenus avec une même méthode et sur un même échantillon homogène, mais dans des laboratoires différents et par différents opérateurs utilisant différents équipements. Des études collaboratives – encore

appelées analyses inter laboratoires ou circuits *d'analyses* –permettent d'évaluer cette reproductibilité. On donnera aussi parfois un sens restreint à cette notion de reproductibilité, en considérant par exemple, dans un même laboratoire, différents opérateurs utilisant le même matériel ou un même opérateur qui exécute la même analyse, mais à des dates très éloignées les unes des autres. **(DUCAUZE. C, 2016) ; (MARCHAND. M, 2013) ; (CEAEQ, 2015)**

Pour ce qui est de la vérification de la précision intermédiaire de la méthode, nous avons effectué trois séries comportant chacune un groupe de 20 essais : série (1) ; série (2) et série (3). Les essais sont effectués par deux analystes différents à des jours différents et chaque échantillon d'analyse est préparé séparément.

Les trois échantillons du standard streptomycine été préparés à partir d'une solution mère d'une concentration de 01 $\mu$ g/ml obtenue en diluant 20 $\mu$ g du standard pur dans 20ml de méthanol. Par la suite nous avons pris un millilitre de cette solution mère pour le reconstituer avec 02 ml de méthanol pour obtenir une concentration de 0,33 $\mu$ g/ml (1/3 de la concentration initiale).

Pour le standard chloramphénicol, nous avons préparé trois solutions, pour chacune d'elle nous avons pris 02mg du standard pour les diluer dans 10ml de méthanol pour obtenir une concentration de 0,2mg/ml.

Pour l'analyse du standard oxytétracycline nous avons mélangé 4mg (standard pur) avec 10 ml de méthanol afin d'obtenir une solution d'une concentration de 0.4 mg/ml.

Les résultats sont exprimés par :

- e) la déviation standard de fidélité intermédiaire (écart type).
- f) Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire (déviation standard relative).
- g) L'intervalle de confiance de la valeur moyenne. (avec un seuil de 05%)
- h) Une comparaison des moyennes arithmétiques des surfaces des pics obtenus et du temps de rétention des standards antibiotiques dans les trois séries d'essais est effectuée en utilisant le test statistique de l'hypothèse nulle (H0) qui suppose qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des trois séries d'essais contre l'hypothèse (H1) qui suppose une différence significative. Le test de Student (test t) est utilisé pour vérifier la justesse de l'hypothèse posée puisque c'est le test le mieux adapté pour les échantillons avec un nombre (n-1) inférieur à 30 ce qui est le cas dans nos séries de test (n= 20-1).

La valeur t calculée pour les moyennes est comparée à la valeur t tabulée dans la table de student pour ce degré de liberté (n=20-1) qui est égal à **2.09** à un seuil de signification de 5%.

La valeur t doit être inférieure à la valeur de t donnée par la table de student, les moyennes théoriques et expérimentales sont alors considérées comme non significativement différentes **(LEROY.P et FARNIR.F, 2006), (BERRAH, 1984).**

## 1.2. LINERARITE

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. **(NOTE EXPLICATIVE CEE III/ 844/87)**

Elle est aussi, la Capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon (Relation linéaire signal – concentration). **(HUBERT PH., 2003) ; (ICH, 1994)**

Afin de vérifier la linéarité de notre méthode d'analyse, nous avons préparé une gamme d'étalonnage avec des concentrations correspondant à des pourcentages en relation avec la concentration de l'échantillon pris comme référence. Notre gamme d'étalonnage correspondait aux pourcentages suivants : 25%, 50 %, 75% et enfin 100%. (cf. tableau N°10)

**Tableau n° 10: concentrations des standards antibiotiques correspondant aux différents niveaux de la gamme d'étalonnage**

	Niveau D'étalonnage	Concentration en standard antibiotique
streptomycine	Niveau 1	0.08 µg/kg
	Niveau 2	0.16 µg/kg
	Niveau 3	0.24 µg/kg
	Niveau 4	0.33 µg/kg
chloramphénicol	Niveau 1	12,5 µg/kg
	Niveau 2	25 µg/kg
	Niveau 3	50 µg/kg
	Niveau 4	100 µg/kg
	Niveau 5	200 µg/kg
oxytétracycline	Niveau 1	100 µg/kg
	Niveau 2	200 µg/kg
	Niveau 3	300 µg/kg
	Niveau 4	400 µg/kg
	Niveau 5	500 µg/kg

Les résultats sont exprimés par :

- a) l'équation de la droite d'étalonnage :  $Y = aX + b$  (dans laquelle  $Y$  = réponse du détecteur ;  $X$  = la concentration de l'échantillon)
- b) Le coefficient de corrélation ( $r$ )

### 1.3. ÉTABLISSEMENT DE LA LIMITE DE DÉTECTION D'UNE MÉTHODE(LDM)

Elle correspond à la plus basse concentration d'un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode d'analyse, incluant le prétraitement et les extractions chimiques, produit un signal détectable, avec une fiabilité statistiquement définie, différent de celui produit par un « blanc » de matrice dans les mêmes conditions. **(DUCAUZE. C, 2016)**

Est la plus petite concentration fournissant un signal significativement différent du *blanc* ; c'est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée dans l'échantillon, mais pas nécessairement quantifiée. « Significativement différent » veut dire qu'on choisit un certain niveau de probabilité : il est de 0,999 pour la *limite de détection standard* ( $t_{1-\alpha} = 3$ ), ce qui correspond à un risque de première espèce  $\alpha$  exactement égal à 0,13 % d'affirmer à tort que l'échantillon est différent du blanc ou dit autrement qu'il contient l'analyte. **(MARCHAND. M, 2013) ; (CEAEQ, 2015)**

#### 1.3.1. Calcul de la limite de détection de la méthode (LDM)

À partir d'une mesure faite sur un blanc analytique, on calcule l'écart type du signal. La limite de détection *LOD* correspond à la concentration qui conduit à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois celle de l'écart type du blanc  $y_d = y_b + 3 s$ . **(ACS, 1980)**

À partir de la limite de détection estimée (LDM estimée) dans notre cas la limite de détection estimée est celle établie par le fournisseur des standards antibiotiques qui est validée en interne et qui est en concordance avec les LMR's fixées par les organismes internationaux spécialisés en l'occurrence : 20µg/ml pour le standard streptomycine, 0.2 mg/ml pour le standard chloramphénicol et 0.4 mg/ml pour le standard oxytétracycline, procéder aux étapes suivantes :

À partir des résultats obtenus de la série d'analyse, nous allons calculés : la moyenne arithmétique (**x**) et l'écart type (**s**) (Cf. **formule annexe N°2**), ce dernier est considéré comme équivalent au bruit fournit par la ligne de base dans un chromatogramme.

La Méthode de calcul de la limite de détection d'une méthode (LDM) est :

**LDM = 3 × s** où **LDM : limite de détection de la méthode;**

**s : écart type**

#### **1.4. ÉTABLISSEMENT DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION DE LA MÉTHODE(LQM)**

Corresponds à la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie. (**MARCHAND. M, 2013**) ; (**CEAEQ, 2015**)

Qu'on définit aussi comme le niveau de mesure auquel la précision de la mesure sera considérée comme satisfaisante pour une détermination quantitative ; en d'autres termes, la limite de quantification est la concentration qui peut être déterminée avec un coefficient de variation – appelé aussi déviation standard – et une justesse acceptable. C'est en fait la limite à partir de laquelle le résultat sera donné avec une probabilité considérée comme acceptable. (**DUCAUZE. C, 2016**)

##### **1.4.1. Calcul de la limite de quantification de la méthode (LQM)**

La limite de quantification *LOQ* est calculée en prenant comme valeur du signal 10 fois la valeur de l'écart type du blanc  $yq = yb + 10 s$ . (**ACS, 1980**)

La Limite de Quantification d'une Méthode est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LDM. Elle est calculée de la manière suivante :

**LQM= 10 X S** où **LQM est la limite de quantification de la méthode ;**

**S est l'écart-type**

## 1.5. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'EXTRACTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES À PARTIR DU MIEL

Dans le but d'éliminer les composants indésirables et d'extraire les résidus d'antibiotiques recherchés dans le miel, la préparation des échantillons se révèle une étape cruciale dans la détection et la quantification des résidus d'antibiotiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).

Les extractions sont différentes : certaines utilisent l'extraction en phase solide (SPE) (**ADAMS S. J et al, 2009**) ; (**VERZEGNASSI L., SAVOY-PERROUD M.C. AND STADLER R.H., 2009**) ; (**WIEST L. et al, 2011**) , d'autres, l'extraction liquide-liquide (**ADAMS S. J et al, 2009**) ; (**LOMBARDO-AGUI M. et al , 2012**) , ou encore une méthode d'extraction QuEChERS, qui est une technique d'extraction récente puisqu'elle est apparue en 2001-2002. (**MORANCAIS M., 2010**)

L'extraction liquide-liquide est la plus efficace sur les aminoglycosides, puisque c'est la seule méthode qui permet leur extraction correctement, ainsi que les tétracyclines, la lincomycine, les céphalosporines et les quinolones. (**RENAUD. D, 2012**)

La méthode d'extraction des résidus de Streptomycine, de Chloramphénicol et d'Oxytétracycline à partir d'échantillons de miel adoptée est basée sur les travaux de (**GAJDA. À et al, 2008**) ; (**VINAS et al, 2007**) ; (**HELIO et al, 2007**) ; (**CAI et al, 2005**) ; (**PENA et al 2005**) and (**DIAZ AND CABANILLAS, 1990**).

Le protocole d'extraction été comme suit :

- a) mettre 05 g de l'échantillon dans un tube à essai ensuite nous avons additionné 10 ml d'acétonitrile et 03ml d'eau pure pour HPLC.
- b) Le mélange est porté au vortex pour homogénéisation d'une durée de 01 minute.
- c) Centrifugation du mélange pendant 10 minutes avec une vitesse de 6000 Tours/ minute.
- d) Récupération du surnageant qui est passé au filtre **Whatmann N° 3**.
- e) On additionne 10ml d'acétonitrile au surnageant filtré et on le fait passer au vortex, pour une deuxième homogénéisation pendant 01 minute.
- f) Une deuxième centrifugation a 3000T/min pendant 05 minutes et en récupère le surnageant.
- g) Le surnageant est passé au système de filtration spécial pour analyse HPLC, avec des pores d'un diamètre de 4.6
- h) Notre échantillon est prêt pour l'analyse qui sera effectuée avec les paramètres adoptés lors des essais d'optimisation sur le standard d'antibiotiques.

### 1.5.1. Effet matrice (EM) dans une analyse quantitative HPLC

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est une technique de choix pour le dosage de diverses substances dans les liquides biologiques. Cependant, ces milieux sont susceptibles de contenir des composés qui vont coéluer avec les analytes d'intérêt et altérer leur ionisation (amplification ou suppression d'ionisation). Ce phénomène, appelé « effet matrice » (EM), peut compromettre la fiabilité des résultats. Il doit donc faire partie intégrante du processus de validation. (DEVILLE. M, 2013)

Pour vérifier l'efficacité de la méthode d'extraction des résidus d'antibiotiques à partir du miel (**effet matrice**), des séries d'analyse ont été effectuées sur un échantillon de miel révélé négatif par l'analyse **Premi®test** et qui a été dopé avec les standards antibiotiques : Streptomycine, Chloramphénicol et l'Oxytétracycline dont les concentrations ont été respectivement : 0,02µg/kg, 0.2 µg/kg et 0.4 µg/kg. Le tableau N°11 résume les informations concernant les échantillons et le nombre d'essais lors des essais de l'extraction.

Tableau N° 11 : échantillon de miel dopé aux standards antibiotiques

	Miel Mansoura	Nombres d'essais
Concentration Standard Streptomycine	0,02µg/kg	5
Concentration Standard Chloramphénicol	0.2 µg/kg	5
Concentration Standard Oxytétracycline	0.4 µg/kg	5

#### 1.5.1.1. Méthodes d'évaluation de l'effet matrice (EM)

La première méthode d'évaluation de l'EM est l'**addition post-extraction** (DEVILLE. M, 2013) dans laquelle on compare le signal donné par un standard, avec et sans matrice:

- A = phase mobile enrichie en standard
- B = matrice extraite puis enrichie en standard
- EM absolu (%) =  $B/A \times 100$  (corrigé ou non par le standard interne)
- EM relatif (%) = CV (corrigé ou non par le standard interne)

Dans son étude **MATUSZEWSKI B.K. ET AL, (2003)** a déterminé l'effet matrice (EM), le rendement de la procédure d'extraction (RECOVERY= RE) et l'efficacité du processus (process efficiency= PE) en comparant les aires de pics. Si on considère que l'aire du pic obtenu du blanc (standard dilué dans la phase mobile) est désignée par la lettre **A**, l'aire du pic obtenu de l'analyse du standard rajouté à l'échantillon avant l'extraction est désignée par la lettre **B** et enfin l'aire du pic obtenu de l'analyse du standard rajouté à l'échantillon après extraction est désigné par la lettre **C**. les valeurs du EM, RE et du PE peuvent être calculer à partir des formules suivantes :

$$ME (\%) = \mathbf{B/A} \times 100$$

$$RE (\%) = \mathbf{C/B} \times 100$$

$$PE (\%) = \mathbf{C/A} \times 100 - (ME - RE) / 100$$

Le EM calculé dans cette étude est référencé comme étant l'effet matrice absolu où le signal enregistré du standard présent dans le plasma est comparé au signal du même standard dilué dans la phase mobile.

La deuxième méthode d'évaluation de l'EM est l'infusion post-colonne (**SOUVERAIN. S et al, 2004**); (**BONFIGLIO. R, 1999**) dans laquelle on injecte la matrice, tandis que l'analyte est infusé en continu.

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. VALIDATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC

#### 2.1.1. fidélité

Dans ces travaux sur la validation des méthodes analytiques, **MAYOR.M et al (2010)**, toutes les valeurs des coefficients de variation été inférieur à 4 %. La valeur admise dans leur protocole été de 10 %.

Dans ses travaux sur la fidélité de sa méthode d'analyse, **MONDEGUER. F, (2007)**, les coefficients de variation de répétabilité (Cvr) et de reproductibilité (CVR) été respectivement de 1,3% et 2,1%, ce qui permet d'affirmer que la variation des résultats est acceptable.

##### 2.1.1.1. Répétabilité

#### a) Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC pour la streptomycine

Le tableau N°12, représente les résultats statistiques de la Répétabilité, l'intégralité des résultats des essais de la vérification de la répétabilité du standard streptomycine sont répertoriés dans l'annexe 04.

Le coefficient de variation (CV%)calculé est de 1,89416 qui est vraiment bas, cela est un bon indicateur de la répétabilité de la méthode d'analyse. En plus en constate qu'il est en concordance avec la littérature qui annonce un coefficient de variation égal ou inférieur à ( $\leq$ ) 10%, pourcentage en deçà duquel la précision de la méthode ne sera pas très fiable (**VINAS. P ET AL, 2007**). Lors de leurs travaux sur la répétabilité, **BENETTI. C et al, (2004)** a trouvé un (CV%) égal à 12.1% pour trois séries d'essais effectuées le même jour.

Ces valeurs concordant avec les recommandations du manuel de la commission du **Codex Alimentarius** qui fixe le Coefficient de variation à 35% comme valeur maximum pour les essais intra-jours, ce qui implique que la méthode est répétable. Ces résultats sont significativement plus bas que la limite fixée par la décision **2002/657/EC** de l'Union Européenne qui est de 10 à 20% en fonction de la concentration de l'analyte.

**Tableau N°12: résultats statistiques de la vérification de la Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol**

Nombre d'essais	10
moyenne	663289,7
écart type	12563,78
Intervalle de confiance	+/- 7786,966
Coef. de variation	1,89416%

### b) Répétabilité de la méthode d'analyse pour le chloramphénicol

Le tableau N°13, représente les résultats statistiques de la Répétabilité, l'intégralité des résultats des essais de la vérification de la répétabilité du standard chloramphénicol sont répertoriés dans l'annexe 05.

Le coefficient de variation calculé est de 3,62296% qui est bas, cela est un bon indicateur de la répétabilité de la méthode d'analyse. En plus on constate qu'il est en concordance avec la littérature qui annonce un coefficient de variation égal ou inférieur à ( $\leq$ ) 10%, pourcentage en deçà duquel la précision de la méthode ne sera pas très fiable. (VINAS. P *et al*, 2007)

ORTELLI *et al* (2004), ont travaillé sur des échantillons de miel dopés avec un standard chloramphénicol avec la concentration de 5 $\mu$ g/kg, ils ont retrouvé un CV% de 5,3% pour une série de 04 essais.

Ces valeurs concordent avec les recommandations du manuel de la commission du **Codex Alimentarius** qui fixe le Coefficient de variation à 35% comme valeur maximum pour les essais intra-jours, ce qui implique que la méthode est répétable. Ces résultats sont significativement plus bas que la limite fixée par la décision **2002/657/EC** de l'Union Européenne qui est de 10 à 20% en fonction de la concentration de l'analyte.

Tableau N°13 : résultats statistiques de la vérification de la Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol

Nombre d'essais	10
moyenne	1026750,4
écart type	24481,37
Intervalle de confiance	+/-57239,8
Coef. de variation	3,62296%

### c) Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC pour l'oxytétracycline

Le tableau N°14 représente les résultats statistiques de la Répétabilité, l'intégralité des résultats des essais de la vérification de la répétabilité du standard Oxytétracycline est répertoriée dans l'annexe 05.

Lors de ses travaux sur les résidus d'oxytétracycline dans le miel, PENA *et al* (2005) ont vérifiés la répétabilité de leur méthode d'analyse HPLC par des séries (n= 6) d'analyse sur des échantillons de miel dopés au standard Oxytétracycline, le coefficient de variation été inférieur à 11%

Ces valeurs concordent avec les recommandations du manuel de la commission du **Codex Alimentarius** qui fixe le Coefficient de variation à 35% comme valeur maximum pour les essais intra-jours, ce qui implique que la méthode est répétable. Ces résultats sont significativement plus

bas que la limite fixée par la décision **2002/657/EC** de l'Union Européenne qui est de 10 à 20% en fonction de la concentration de l'analyte.

**Tableau N°14 : résultats statistiques de la vérification de la Répétabilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol**

Nombre d'essais	10
moyenne	46134,2
écart type	2557,08
Intervalle de confiance	+/-2683.93
Coef. de variation (CV%)	5,54271%

**2.1.1.2. Reproductibilité (fidélité intermédiaire)**

**A) Vérification de la reproductibilité de la méthode d'analyse de la streptomycine**

Nous avons utilisé le test d'hypothèse de Student de comparaison de moyennes sur trois série de 20 analyses chacune. L'intégralité des résultats des essais de la vérification de la reproductibilité du standard streptomycine sont répertoriés dans le tableau N° de l'annexe 04.

Cette procédure nous a permis d'effectuer une comparaison des moyennes entre les trois séries effectuées pour la vérification de la reproductibilité de notre méthode, le tableau N°15, représente un résumé des statistiques effectuées.

**Tableau N° 15: résumé de l'étude statistique de la reproductibilité de la méthode d'analyse HPLC pour le standard streptomycine**

	Série 1	Série 2	Série 3
<b>Effectif</b>	20	20	20
<b>Moyenne</b>	101505,	96885,8	93465,6
<b>Écart-type</b>	6903,51	10211,4	5999,18
<b>Coef. de variation</b>	6,80114%	10,5396%	6,4186%
<b>Intervalle de confiance au seuil <math>\alpha</math> = 5%</b>	101505, +/- 3230,95 [98274,2, 104736,]	96885,8 +/- 4779,07 [92106,7, 101665,]	93 465 ,6 +/- 5579,6 [87886, 99 045,2]
<b>Minimum</b>	91787,0	78388,0	84920,0
<b>Maximum</b>	117000,	113552,	107786,

## Test t de comparaison des moyennes

### **a) Comparaison des moyennes entre série 1 et série 2**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 1 = moyenne série 2

L'Hypothèse alternative : moyenne série 1  $\neq$  moyenne série

En supposant l'égalité des variances : **t calculé (20-1) = 1,67602 < t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = 0,101945

On a effectué un test t de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 1 et 2. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant. Il s'étend de -960,2 à 10199,0. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. **L'hypothèse H0 est acceptée.**

### **b) Comparaison des moyennes entre la série 02 et la série 03**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 2 = moyenne série 3

L'Hypothèse alternative : moyenne série 2  $\neq$  moyenne série3

En supposant l'égalité des variances : **t calculé (20-1) = 1,29151 < t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = **0,204329**

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 2 et 3. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de -1940,86 à 8781,26. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée.

### **c) Comparaison des moyennes entre la série 01 et la série 03**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 1 = moyenne série 3

L'Hypothèse alternative : moyenne série 1  $\neq$  moyenne série3

En supposant l'égalité des variances : **t = 1,93115 < t table (20-1)=2,093** Probabilité = **0,000346197**

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 1 et 3. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de 3899,5 à 12179,7. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée. Le tableau N°16, récapitule l'ensemble des résultats du test T de Student pour les trois séries de la fidélité intermédiaire.

Tableau N°16 : résultat du test T de student de comparaison des moyennes pour la streptomycine

	Moyennes à comparer	"t" calculé (ct)	Table "t" (tt)	Seuil d'acceptabilité ( $\alpha$ )	tc vs tt
Streptomycine	1/2	1,67602	2.09	5%	tt>tc
	2/3	1,29151	2.09	5%	tt>tc
	1/3	1,93115	2.09	5%	tt>tc

### B) Vérification de la reproductibilité de la méthode d'analyse du chloramphénicol

Nous avons effectué trois séries d'analyse comportant chacune 20 essais sur des échantillons préparés en interne à base du standard chloramphénicol. Les résultats issus des calculs statistiques sont résumés dans le tableau N°17.

L'intégralité des résultats des essais de la vérification de la reproductibilité de la méthode d'analyse du standard chloramphénicol sont répertoriés dans l'annexe 04.

Tableau N° 17 : résumé de l'étude statistique de la reproductibilité de la méthode d'analyse HPLC du chloramphénicol

	Série 1	Série 2	Série 3
Effectif	20	20	20
Moyenne	3,94196E6	3,90143E6	3,86921E6
Écart-type	122303,	135123,	124151,
Coef. de variation	3,1026%	3,46342%	3,20868%
Intervalle de confiance ( $\alpha= 5\%$ )	: 3,94196E6 +/- 57239,8 [3,88472E6, 3,9992E6]	3,90143E6 +/- 63239,5 [3,83819E6, 3,96466E6]	3,86921E6 +/- 58104,4 [3,81111E6, 3,92731E6]
Minimum	3,69529E6	3,46852E6	3,6398E6
Maximum	4,1486E6	4,14675E6	4,11325E6

## Test t de comparaison des moyennes

### **a) Comparaison des moyennes entre la série 01 et la série 02**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 1 = moyenne série 2

L'Hypothèse alternative : moyenne série 1  $\neq$  moyenne série 2

En supposant l'égalité des variances : **t (20-1) calculé = 0,994757 < t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = 0,326147

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 1 et 2. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de -41961,0 à 123040. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée.

### **b) Comparaison des moyennes entre la série 02 et la série 03**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 2 = moyenne série 3

L'Hypothèse alternative : moyenne série 2  $\neq$  moyenne série 3

En supposant l'égalité des variances : **t calculé = 0,78513 < t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = 0,437245

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 2 et 3. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de -50848,9 à 115279. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée.

### **c) Comparaison des moyennes entre la série 01 et la série 03**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 1 = moyenne série 3

L'Hypothèse alternative : moyenne série 1  $\neq$  moyenne série 3

En supposant l'égalité des variances : **t calculé = 0,78513 < t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = 0,437245

Ne pas rejeter l'hypothèse nulle pour  $\alpha = 0,05$ .

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 1 et 3. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant Il s'étend de -50848,9 à 115279. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée. Le tableau N°18, récapitule l'ensemble des

résultats du test T de Student pour les trois séries de la fidélité intermédiaire.

Tableau N°18 : résultat du test T de student de comparaison des moyennes pour le chloramphénicol

	Moyennes à comparer	"t" calculé (ct)	Table "t" (tt)	Seuil d'acceptabilité (α)	ct vs tt
Chloramphénicol	1/2	0,99475	2.09	5%	tt>tc
	2/3	0,78513	2.09	5%	tt>tc
	1/3	0,78513	2.09	5%	tt>tc

**C) VERIFICATION de la reproductibilité de la méthode d'analyse de l'Oxytétracycline**

Nous avons effectué trois séries d'analyse comportant chacune 20 essais sur des échantillons préparés en interne à base du standard oxytétracycline. Les résultats issus des calculs statistiques sont résumés dans le tableau N°19.

L'intégralité des résultats des essais de la vérification de la reproductibilité de la méthode d'analyse du standard oxytétracycline sont répertoriés dans l'annexe 04.

Tableau N° 19 : résumé de l'étude statistique de la reproductibilité de la méthode d'analyse HPLC de l'oxytétracycline

	Série n°1	Série n°2	Série n°3
<b>Nombre d'essais</b>	20	20	20
<b>Moyenne</b>	41873,8	41468,9	42206,7
<b>Écart-type</b>	1204,7	1216,19	1243,49
<b>Coefficient de variation</b>	2,87697%	2,93276%	2,94618%
<b>Intervalle de confiance à un seuil de risque α= 5%</b>	41873,8 ± 563.8	41468,9 ± 569.2	42206,7 ± 582.0

## Test t de comparaison des moyennes

### **a) Comparaison des moyennes entre la série 01 et la série 02**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 1 = moyenne série 2

L'Hypothèse alternative : moyenne série 1  $\neq$  moyenne série 2

En supposant l'égalité des variances : **t (20-1) calculé = 1,05779** < **t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = **0,29683**

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 1 et 2. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de -369,999 à 1179,8. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée.

### **b) Comparaison des moyennes entre la série 02 et la série 03**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 2 = moyenne série 3

L'Hypothèse alternative : moyenne série 2  $\neq$  moyenne série 3

En supposant l'égalité des variances : **t calculé = -1,89686** < **t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = **0,0654664**

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 2 et 3. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de -1525,1 à 49,6038. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée.

### **c) Comparaison des moyennes entre la série 01 et la série 03**

On suppose l'Hypothèse nulle : moyenne série 1 = moyenne série 3

L'Hypothèse alternative : moyenne série 1  $\neq$  moyenne série 3

En supposant l'égalité des variances : **t calculé = -0,859765** < **t table (20-1)=2,093** pour une Probabilité = **0,39531**

On a effectué un test **t de Student** de comparaison des moyennes des deux séries d'analyse 1 et 3. L'intervalle de confiance pour la différence entre les moyennes est particulièrement intéressant il s'étend de -1116,58 à 450,877. Comme l'intervalle contient la valeur 0, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons au niveau de confiance de 95,0%. L'hypothèse H0 est acceptée.

Tableau N°20 : résultat du test T de student de comparaison des moyennes pour l'oxytétracycline

	Moyennes à comparer	"t" calculé (ct)	Table "t" (tt)	Seuil d'acceptabilité (α)	ct vs tt
oxytétracycline	1/2	1,05779	2.09	5%	tt>tc
	2/3	-1,89686	2.09	5%	tt>tc
	1/3	-0,85976	2.09	5%	tt>tc

## Conclusion

Dans les trois tests de comparaison des moyennes, le t calculé est toujours inférieur au t table pour n-1= 19 et pour le seuil d'acceptabilité  $\alpha= 0,05$  (5%), ce qui signifie que notre méthode d'analyse est répétable et reproductible (fidélité conforme).

### 2.1.2. Vérification de la linéarité

L'étude de la linéarité vérifie la corrélation entre la concentration de l'analyte dans une solution et la réponse du système à cette concentration qui doit être proportionnelle, elle est exprimée par le coefficient de corrélation (**r<sup>2</sup>**) qui doit être le plus proche de 1. (CDER, FDA, 1994)

#### 2.1.2.1. Vérification de la Linéarité de la méthode d'analyse HPLC pour la streptomycine

La linéarité de la méthode d'analyse de la streptomycine, a été vérifiée par une série de quatre essais, dont les concentrations des échantillons analysés et les valeurs des pics obtenus sont représentées dans le tableau N°21 :

Tableau N°21: valeurs des pics proportionnelles à la concentration d'échantillons de streptomycine

Niveau d'étalonnage	Concentration (µg/ml)	% / concentration référence	Valeur (en points)
Niveau 01	0.08	25%	29817
Niveau 02	0.16	50%	59775
Niveau 03	0.24	75%	80771
Niveau 04	0.33	100%	95304

L'équation de la régression linéaire est établie d'une façon automatique par le logiciel pilotant l'analyse, comme le démontre la figure 10, où le coefficient de corrélation (**r<sup>2</sup>**) est d'une valeur de 0.939646, proche de 1, ce qui est un bon indicateur sur la linéarité.

Dans son travail sur la mise au point d'une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le miel par analyse chromatographique, lors de la vérification de la linéarité de la méthode pour l'analyse de streptomycine, **RENAUD. D, (2012)**, a observé un coefficient de corrélation ( $r^2$ ) de 0,9954

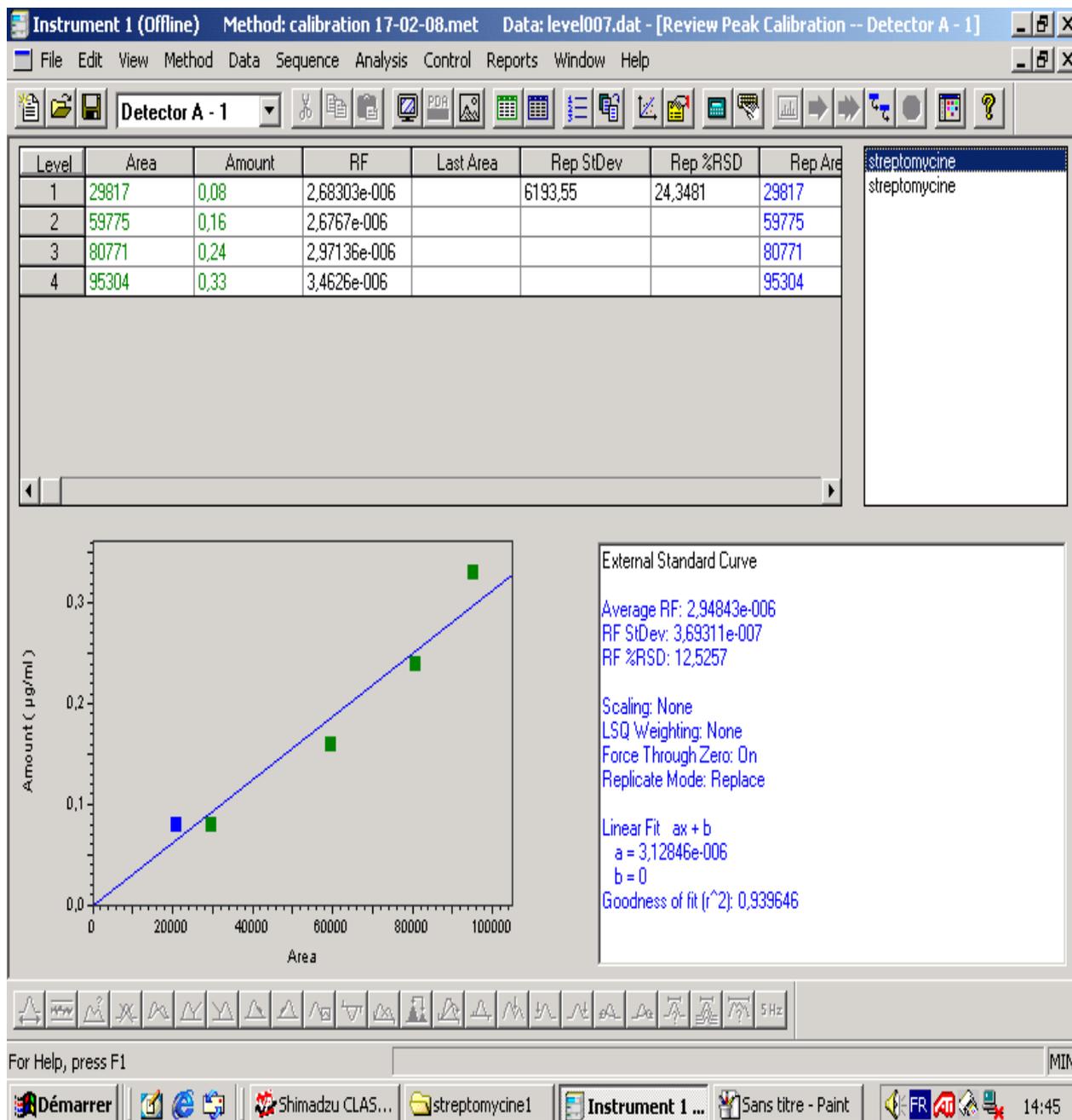


Figure N°10 : courbe d'étalonnage de la streptomycine

2.1.2.2. Vérification de la Linéarité de la méthode d'analyse HPLC pour le chloramphénicol

Pour vérifier la linéarité de la méthode, nous avons procédé par l'analyse de cinq échantillons avec des concentrations qu'on fait doubler a chaque niveau d'étalonnage les concentrations ainsi que les valeurs des pics obtenus sont représentés dans le tableau N°22 :

Tableau N°22: valeurs des pics proportionnelles à la concentration d'échantillons de chloramphénicol

Le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) comme l'indique la figure 11 est d'une valeur de 0.999868, cette valeur proche de 1 est synonyme d'une bonne linéarité.

Niveau d'étalonnage	Concentration (mg/ml)	% / concentration de référence	Valeur (en points)
Niveau 01	0.0125	6,25%	349,961
Niveau 02	0.25	12,5%	721,298
Niveau 03	0.050	25%	1, 357,352
Niveau 04	0.1	50%	2, 626,651
Niveau 05	0.2	100%	5, 283,213

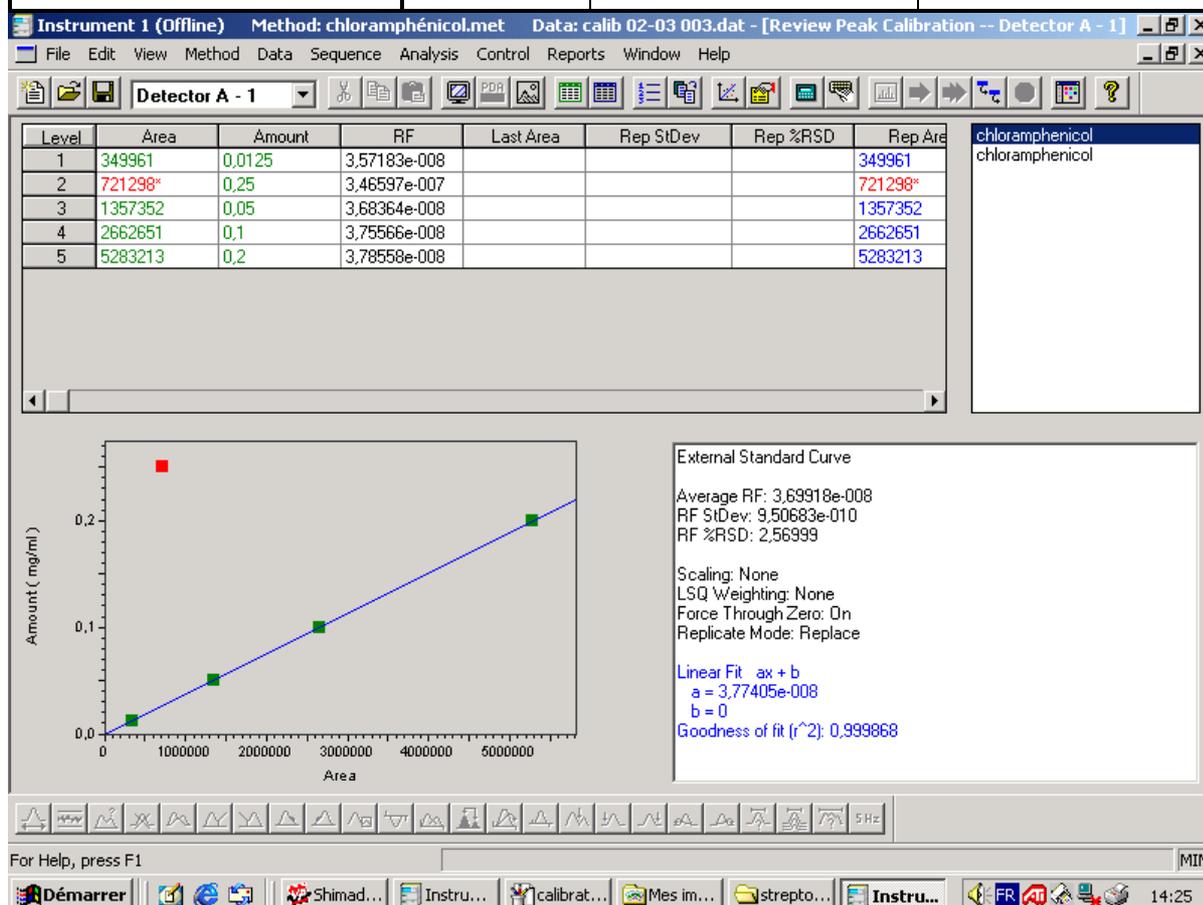


Figure N°11 : courbe d'étalonnage du chloramphénicol

CALVARESE S, (2006), lors de l'étude de la linéarité de sa méthode d'analyse pour la détection et la quantification des résidus de chloramphénicol a constaté un coefficient de corrélation ( $r^2$ ) de 0.9996, ce dernier est très proche du résultat de vérification de la linéarité de notre méthode

d'analyse qui est de (0,9998), ce même coefficient est proche de 1 ce qui renseigne sur une bonne linéarité de la méthode.

### 2.1.2.3. Vérification de la Linéarité de la méthode d'analyse HPLC pour l'oxytétracycline

Pour vérifier la linéarité de la méthode, nous avons procédé par l'analyse de cinq échantillons avec des concentrations qu'on a fait doubler à chaque niveau d'étalonnage les concentrations ainsi que les valeurs des pics obtenus sont représentées dans le tableau N°23 :

**Tableau N°23: valeurs des pics proportionnelles à la concentration d'échantillons de l'oxytétracycline**

Niveau d'étalonnage	Concentration (mg/ml)	% / concentration de référence	Valeurs des surfaces (en points)
Niveau 01	0.1	20%	37289
Niveau 02	0.2	40%	47471
Niveau 03	0.3	60%	81083
Niveau 04	0.4	80%	109884
Niveau 05	0.5	100%	136709

La linéarité de la méthode est vérifiée sur 5 points de gamme d'étalonnage dans une gamme de concentrations de 10 à 50 µg/kg en oxytétracycline. Le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) est égal à 0,9795. La droite de régression est établie sur 5 points de gamme. L'équation du modèle linéaire postulé est :  $y = 4560,9x - 7385,1$ . (Voir figure N°12)

Dans ses travaux sur la linéarité **PENA. N, (2005)**, a obtenu La courbe d'étalonnage été en utilisant la procédure de droite de régression des carrés des pics proportionnelle à la concentration. Le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) été égal à 0.9990

Pour 10 essais de calibration à partir de blanc dopé au standard oxytétracycline sur trois jours, en concordance avec la décision 2002/657/EC.

Pour **COYNE. R, (2004)**, la linéarité de la méthode été établie pour une gamme de concentration allant de 0.04 à 2.0 µg/kg le coefficient corrélation calculé ( $r^2 = 0.999$ ) été très proche de 1. L'équation de la droite de régression ( $y = 1.327x + 0.00067$ ) été obtenue par l'analyse de la régression linéaire des deniers carrés.

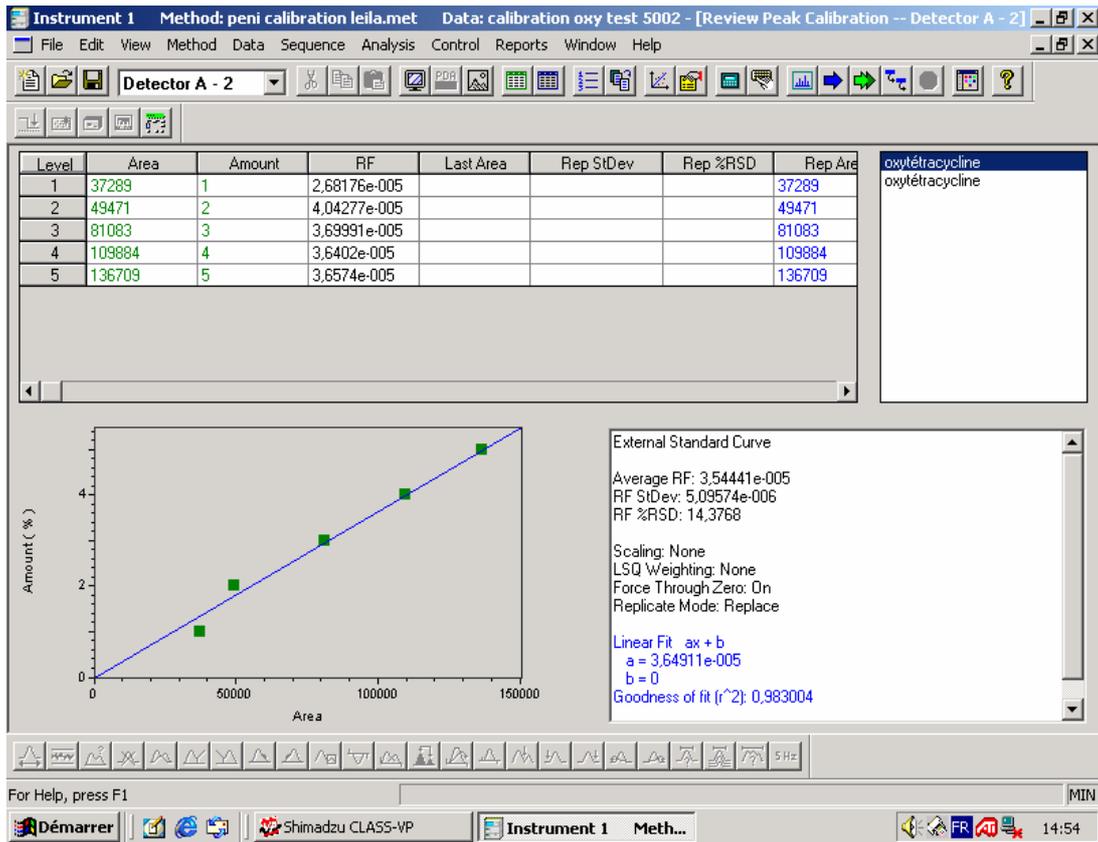


Figure N°12 : courbe d'étalonnage de l'oxytétracycline

### 2.1.3. Limite de détection et de quantification de la méthode d'analyse HPLC

La limite de détection et de quantification est déterminée par le nombre de points couvert par l'aire du pic enregistré.

La limite de détection observée pour notre méthode d'analyse HPLC pour la streptomycine, le chloramphénicol et l'oxytétracycline été respectivement de : **0.006, 0.024 et 0.06 µg/kg (particule per billion= PPB)**.

La limite de quantification observée pour notre méthode d'analyse HPLC pour la streptomycine, le chloramphénicol et l'oxytétracycline été respectivement de : **0.02, 0.08 et 0.2 µg/kg (particule per billion= PPB)**. (Voir Tableau N° 24).

Tableau N°24: valeurs calculées de la limite de détection et de quantification (LOD/LOQ) de notre méthode d'analyse HPLC pour les résidus de streptomycine, chloramphénicol et oxytétracycline

	STREPTOMYCINE		CHLORAMPHENICOL		OXYTETRACYCLINE	
	Valeur en points de surfaces	Valeurs en µg/kg	Valeur en points de surfaces	Valeurs en µg/kg	Valeur en points de surfaces	Valeurs en µg/kg
<b>Nombres d'essais</b>	10	10	10	10	10	10
<b>moyennes (m)</b>	663289.7	0,01	3782646.4	0.2	46134,2	0,4
<b>Écart-type(S)</b>	12563.78	0.002	145733.37	0.008	2557,08	0,02
<b>Limite de détection LD=S x 3</b>	37691.34	0.006	437199.33	0.024	7671,4	0,06
<b>Limite de quantification LQ=S x 10</b>	125 637.8	0.02	1457333.7	0.08	25570,8	0,2

**CALVARESE S, (2006)** a travaillé sur la validation d'une méthode d'analyse chromatographique pour les résidus de chloramphénicol. La limite de détection (en prenant en compte un ratio signal/bruit de 3:1) été de 0.15µg/kg, alors que la limite de quantification de la méthode d'analyse (le niveau d'étalonnage le plus bas qui permet d'évaluer la précision et l'exactitude de la méthode) été de 0.3 µg/kg.

En concordance avec la décision 2002/657/EC concernant les performances des méthodes d'analyse. Pour **PENA.N, (2005)**, la limite de détection et de quantification ont été élaborées en utilisant trois essais différents sur des échantillons de miel exemptent de résidus fortifiés (dopés) avec des concentrations d'oxytétracycline et de tétracycline de : 50, 100, 150, et 200 µg/kg, la limite de détection obtenue été de 20 et 21 µg/kg, pour l'oxytétracycline et la tétracycline respectivement, quant à la limite de quantification elle été de 49 et 50 µg/kg, respectivement pour l'oxytétracycline et la tétracycline.

Pour **COYNE. R, (2004)**, la limite de quantification de la méthode d'analyse été de 0.04 µg/kg

Dans ses travaux, **VINAS. P, (2007)**, la limite de détection été calculée sur la base de 3S (où S est la déviation standard du bruit du signal capté) et la limite de quantification sur la base de 10S.

#### 2.1.4. ESSAIS D'EXTRACTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

L'extraction liquide-liquide(LLE) a été exploitée comme procédure d'extraction pour les aminoglycosides et les macrolides à partir de matrice complexe. **(MCGLINCHEY. T A, 2008)**

Nous avons adopté la même approche lors de nos essais sur la méthode d'extraction où nous avons travaillé sur des blancs et des échantillons dopés aux différents standards.

Nous avons effectué 3 séries de cinq essais pour le l'échantillon dopé aux standards : streptomycine, chloramphénicol et l'oxytétracycline et une série sur un échantillon témoin.

La figure N°13, montre le chromatogramme obtenu avec un échantillon dopé avec une concentration de 0.02µg/kg du standard streptomycine, le pic apparaît à 2.617 minutes ce qui correspond exactement au temps de rétention obtenu lors des essais d'optimisation, cela indique que la streptomycine extraite des échantillons de miel dopé analysé avec les mêmes paramètres optimisés a été reconnue par notre système HPLC étalonné.

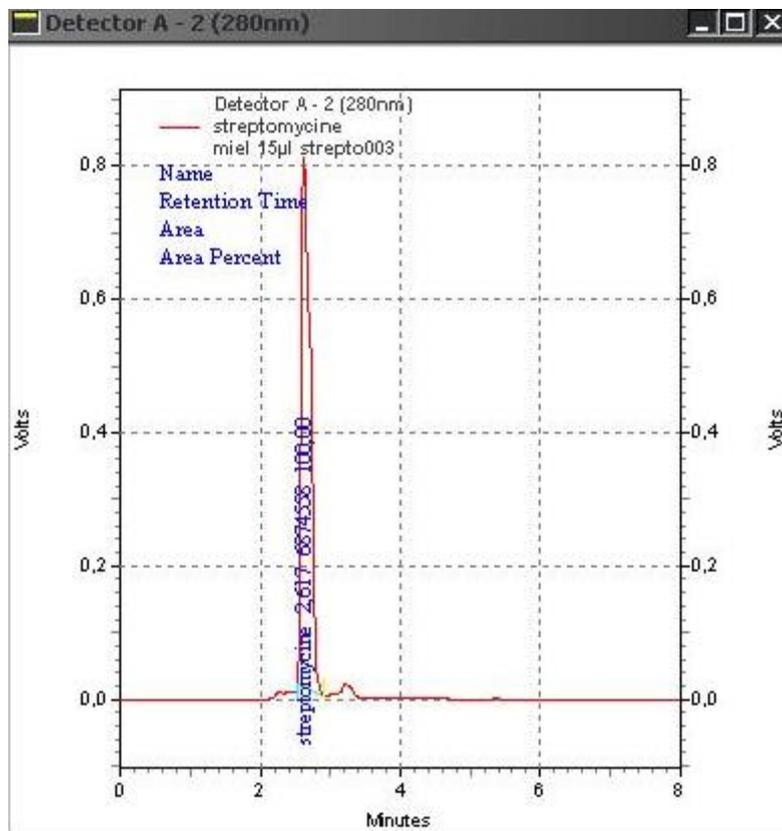


Figure N°13 : chromatogramme obtenu par une analyse de miel dopé par le standard streptomycine

La figure N°14, montre le chromatogramme obtenu avec un échantillon dopé à une concentration de 0.2µg/kg du standard chloramphénicol, le temps de rétention été de 2.183 minutes ce qui est proche du temps de rétention obtenu lors des essais d'optimisation, cela indique que le standard chloramphénicol qui a subit le processus d'extraction avec les échantillons de miel analysé avec les mêmes paramètres optimisés a été reconnue par notre système HPLC étalonné.

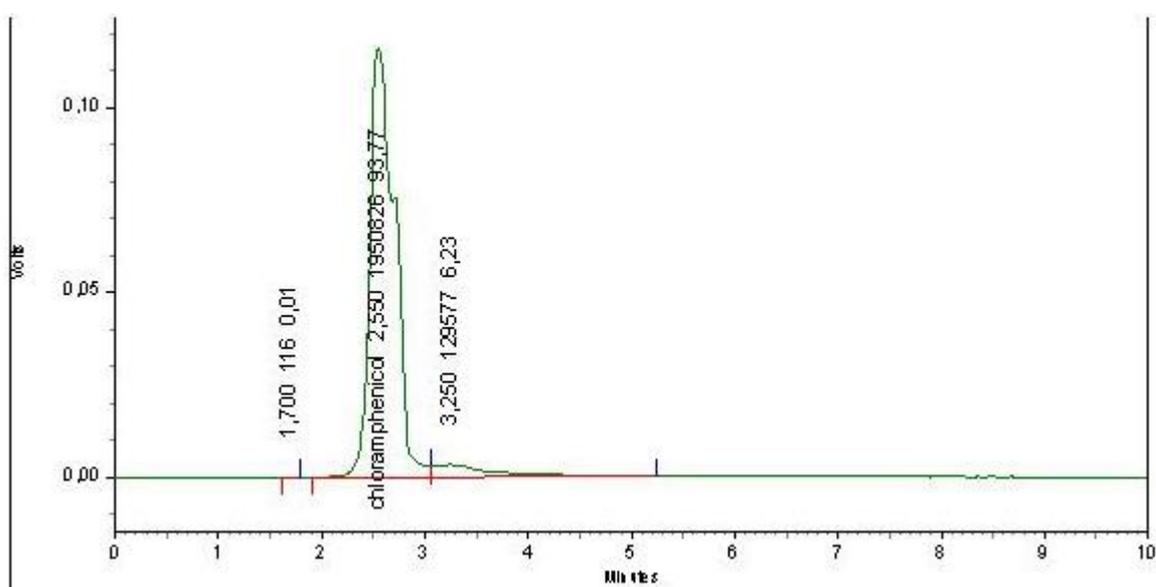
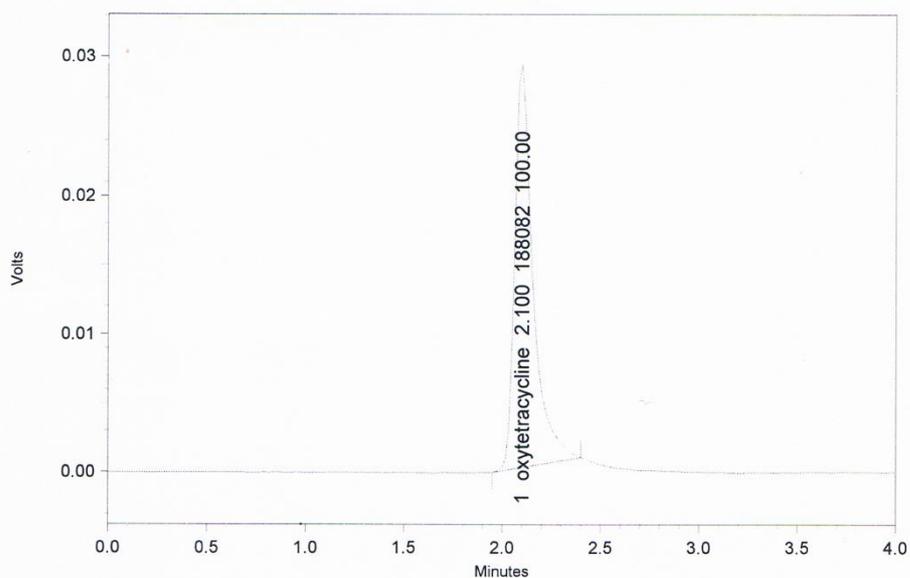


Figure N°14 : chromatogramme obtenu par une analyse de miel dopé par le standard chloramphénicol

La figure N°15, montre le chromatogramme obtenu avec un échantillon dopé à une concentration de 0.4µg/kg du standard oxytétracycline, le temps de rétention été de 2.050 minutes ce qui est proche du temps de rétention obtenu lors des essais d'optimisation, cela indique que le standard oxytétracycline qui a subit le processus d'extraction avec les échantillons de miel analysée avec les mêmes paramètres optimisés a été reconnue par notre système HPLC étalonné.



Detector A - 1  
(325nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent
1	oxytetracycline	2.100	188082	100.00

Totals			188082	100.00
--------	--	--	--------	--------

**Figure N°15: chromatogramme obtenu par une analyse de miel dopé par le standard oxytétracycline**

La figure N° 16, représente le chromatogramme obtenu par l'analyse d'échantillons témoins, on remarque l'absence de pic tout au contraire des échantillons de miel dopés aux standards antibiotiques.

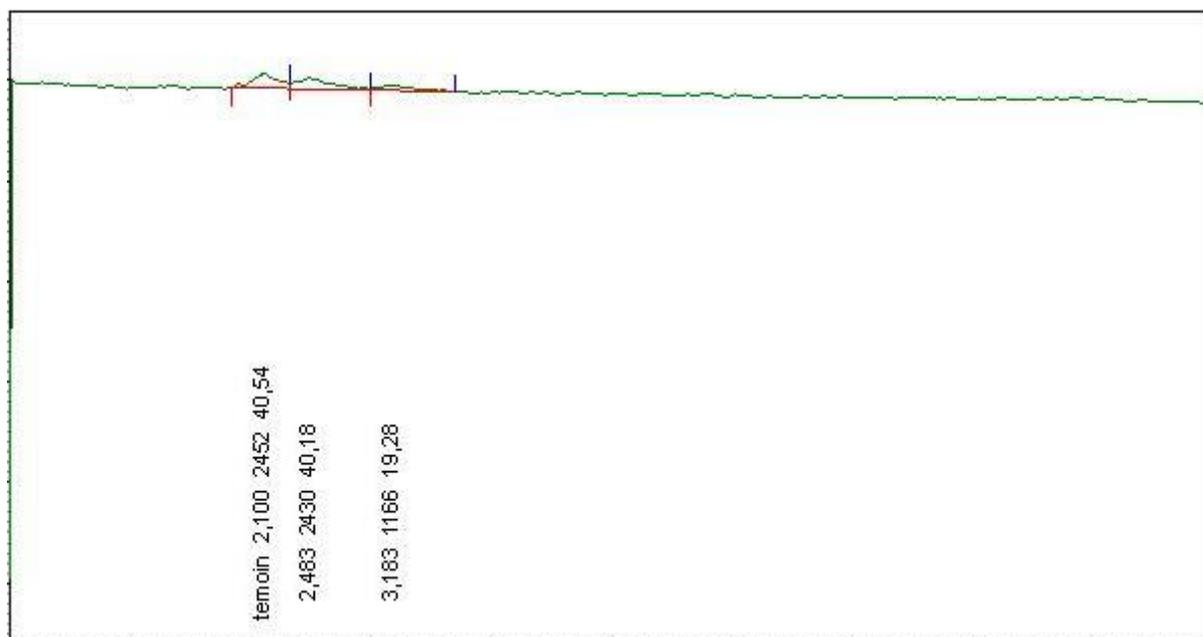


Figure N°16 : chromatogramme obtenu par une analyse d'échantillons de miel témoin

### 2.1.4.1. Vérification de l'effet matrice

Pour vérifier l'effet matrice et l'efficacité de notre protocole d'extraction, nous avons effectué au total 15 analyses (5 essais pour chaque standard) d'échantillon qui ont subi le procédé d'extraction après avoir été dopés par les trois standards. (Voir le tableau N° 25)

Tableau N°25 : résultats obtenus des essais d'extraction des résidus d'antibiotique à partir du miel

	streptomycine		chloramphénicol		oxytétracycline	
	temps de rétention (minutes)	surface des pics en points	temps de rétention (minutes)	surface des pics en points	temps de rétention (minutes)	surface des pics en points
TEST 1	2.517	159 259	2.183	2230 000	2,050	40952
TEST 2	2.517	133 665	2.183	2 162 152	2,050	42963
TEST 3	2.517	137 727	2.183	2 163 552	2,050	43797
TEST 4	2.517	48 903	2.183	2 266 631	2,050	47932
TEST 5	2.533	413 577	2.183	2 301 689	2,050	44550

Les surfaces des pics des cinq essais pour chaque standard sont ensuite utilisées pour le calcul du pourcentage de rendement de notre méthode d'extraction. Nous avons calculé la moyenne des aires des pics pour l'échantillon dopé aux standards d'antibiotiques ainsi que la moyenne des temps de rétention respectifs pour chaque série d'analyse, ensuite nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux des étalons préparés avec la phase mobile seulement. Le tableau n° 26 récapitule les différents pourcentages de rendement obtenus pour chaque standard.

Pour les pourcentages de rendement, nous avons observé respectivement : 16.48 % pour la streptomycine, **59.67%** pour le chloramphénicol et **94.02%** pour l'oxytétracycline.

Le pourcentage de rendement de la streptomycine est assez faible, cela peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas utilisé une phase acide dans notre protocole d'extraction.

Pour le chloramphénicol et l'oxytétracycline, les pourcentages de rendement sont satisfaisants.

Concernant le temps de rétention pour les trois standards, il a varié légèrement, mais les pourcentages de rendement sont restés toujours proches de 100%, ce qui indique que le paramètre temps de rétention n'a pas été affecté par l'effet matrice.

**Tableau N°26 : résultats obtenus lors de la vérification de l'efficacité du processus d'extraction des résidus d'antibiotique à partir du miel**

	STREPTOMYCINE	CHLORAMPHENICOL	OXYTETRACYCLINE
moyenne de l'aire du pic de A	1083304,8000	3728109,4000	46838,8000
moyenne de l'aire du pic de C	178626,2000	2224804,8000	44038,8000
Efficacité du processus d'extraction (PE= process effeciency= C/A x100) %	<b>16.48 %</b>	<b>59.67%</b>	<b>94.02%</b>
Moyenne du temps de rétention (TR) A	2.617	2.133	2.067
Moyenne du temps de rétention(TR) C	2.517	2.183	2.050
TR C/ TR A x 100	<b>96.17%</b>	<b>102.34</b>	<b>99.17%</b>

**ZHEN YF, (2007) et WANG. J, (2005)**, ont constatés que le pourcentage de rendement de la méthode d'extraction trouvé été inférieur à 60%, cela peut s'expliquer par l'effet matrice. Nombreux auteurs ont reportés que l'extraction avec l'acétonitrile est prioritaire à la purification des extraits par l'hexane. De ce fait, nous avons adopté l'acétonitrile pour notre méthode d'extraction.

**Pour VINAS. P, (2007)**, les pics du chromatogramme sont tout d'abord identifiés en comparant les temps de rétention du standard streptomycine (STR) et dihydrostreptomycine (DHSTR) dans des blancs et le temps de rétention de ces mêmes standards dans des échantillons dopés. La valeur moyenne du temps de rétention été de : STR,  $16.4 \pm 0.23$  et DHSTR,  $18.2 \pm 0.19$ . Ces valeurs indiquent que le temps de rétention de la streptomycine dans différentes matrices (effet matrice) n'est pas affecté.

Les valeurs moyennes du pourcentage de rendement de la méthode d'extraction dans des échantillons analyses été: pour la streptomycine STR,  $98 \pm 1.8$  et la dihydrostreptomycine DHSTR,  $96 \pm 3.7$ . Ces résultats démontrent que la méthode d'extraction est satisfaisante. **(VINAS. P, 2007)**

À deux niveaux de concentration, le rapport des concentrations mesurées entre des échantillons vierges (n=6) extraits puis surchargés (n=6) et des échantillons (n=6) surchargés directement dans le solvant utilisé en post-extraction (H2O) été supérieur à la limite de tolérance (REF >50%).

Ils été de l'ordre de : 73.79 % 83.31 % respectivement pour les deux niveaux de concentration. **CHOVELON. G, (2015)**

## **CONCLUSION DE LA DEUXIÈME PARTIE**

Nous avons procédé à l'optimisation des paramètres d'analyse du chloramphénicol de l'oxytétracycline et de la streptomycine, en utilisant des standards purs de ces trois antibiotiques. Une fois les paramètres optimisés et fixés, nous avons procédé à des essais pour adapter une méthode d'extraction des résidus de chloramphénicol, d'oxytétracycline et de streptomycine à partir d'échantillons de miel. Les résultats préliminaires sont très satisfaisants, notre système HPLC est parvenu à détecter les résidus de tétracycline de streptomycine et de chloramphénicol dans les échantillons dopés et qui ont subits l'extraction.

Les tests effectués pour la validation de notre méthode d'analyse chromatographique ont révélé des résultats très promoteurs, la fiabilité et la précision révèlent une bonne répétabilité et une bonne précision intermédiaire ainsi qu'un coefficient de variation très appréciable.

L'établissement de la droite de régression et le coefficient de corrélation calculé concordent avec une bonne linéarité de notre méthode d'analyse.

L'établissement de la limite de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques nous permet de connaître les limites d'analyse de notre système HPLC et de comparer ces résultats obtenus à des LMR

Ces résultats encourageants vont servir de base pour des investigations expérimentales plus approfondies portant sur l'étude de la cinétique des antibiotiques, l'analyse des échantillons à grande échelle ayant pour but la détermination des taux minimums des résidus (LMR) pour différents produits alimentaires d'origine animale en Algérie.

La finalité d'une étude telle que celle que nous avons réalisée reste donc la constitution de bases de données scientifiquement exploitables par les pouvoirs publics, pour l'élaboration de réglementations et des prises de décisions visant à protéger la santé des consommateurs. En effet, l'Algérie à l'instar de nombreux pays du continent accuse un retard par rapport au reste du monde en matière de réglementation des résidus d'antibiotiques dans les denrées et ne possède pas de véritables plans de surveillance de la commercialisation, de l'utilisation et de la présence des résidus d'antibiotiques dans les DAOA. Ce qui nous amène à formuler un certain nombre de recommandations :

- Aux pouvoirs publics pour l'adoption rapide des textes règlementant la présence des résidus d'antibiotique dans les denrées alimentaires et le renforcement des capacités des laboratoires de contrôle
  
- Aux éleveurs pour l'abandon des mauvaises pratiques, la santé animale devant incomber uniquement aux professionnels (vétérinaire et auxiliaires bien formés)
  
- Aux vétérinaires pour une plus grande rigueur dans la délivrance des ordonnances et la vente des antibiotiques
  
- Aux associations de consommateurs pour plus de sensibilisation sur le sujet et une réelle implication dans les organismes de normalisation nationaux.

## **Liste des références bibliographiques**

### **1. ABIDI. K (2004)**

Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson.

Thèse : Médecine vétérinaire, École nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie, p 6-23.

### **2. ABLAINE ML (2004)**

Les antibiotiques. p4.

### **3. ADAMS S. J., FUSSELL R. J., DICKINSON M., WILKINS S. AND SHARMAN M., (2009)**

"Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies and the effect of the shook swarm procedure". *analytica chimica acta* ( 2 0 0 9 ) 637: 315–320.

### **4. ADEL REZGUI, (2009)**

Analyse des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires en Tunisie : Les tétracyclines, les quinolones, et les sulfamides (2009), page 13.

### **5. ADELINE. MT. X.P, WANG. C (1997)**

Evaluation of Taxoids from *TAXUS* sp. Crude Extracts by High Performance Liquid Chromatography.

### **6. AGENCE FRANÇAISE DE NORMALISATION AFNOR, (2014).**

Rapport d'étude pour la validation AFNOR du Premi®Test. Code d'étude : VV.

### **7. AGENCE FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR), (2006)**

Rapport d'étude préliminaire pour la validation AFNOR du Premi®Test. Code d'étude : VV.

### **8. ALIX LEFIEF-DELCOURT (2010)**

LE MIEL MALIN. Edition LEDUC. 29 boulevard Raspail, 75007 Paris. France.

### **9. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY ACS, (1980)**

Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry, *Analytical chemistry*, **52**, 14, 2242-2249.

### **10. AL-WAILI NS, HAQ A (2004)**

Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. *J Med Food* 2004; 7: 491-494.

### **11. AL-WAILI N, SALOM K, AL-GHAMDI A, ANSARI MJ (2012)**

Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards.

The Scientific World Journal Volume 2012, 1-9.

### **12. ALIPPI. AM et Al , (2007)**

Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Vet Microbial*\_2007 Dec 15; 125(3-4):290-303. Epub 2007 May 25.

**13. ANDRE, S.AGRIRESEAU (2002)**

MAPAQ-CQIASA Laboratoire de pathologie animal, Québec. La Loque américaine.

<http://www.agrireseau.qc.ca/apiculture/documents/loqueamericaine.pdf>

**14. ARCHIMBAULT. PH, AUBERT. A, HAAS. P, CLEMENT. M.C, DAMARIA. M (1978).**

Résidus de cloxacilline et de néomycine dans le lait après leurs administrations, en association, par voie galactophore. Recueil de médecine vétérinaire, n°154, p 951-956.

**15. ARTS. C, GEIJP. E, STARK. J, WITKAMP. R (2000)**

The Premi®Test for screening for residues of antimicrobial compounds in meat, organs and urine. TNO report V99.1031.

**16. AUDIGIE CL, DUPONT G, ZONZAIN F (1995)**

Principes des méthodes d'analyse biochimiques p 44.

**17. BABCAN S, PIVARNIK LF, RAND AG (2002)**

Honey amylase activity and food starch degradation. J Food Sci 67: 1625–1630.

**18. BABI . S, AŠPERGER. D, MUTAVDŽI . D, HORVAT. A-J-M, KAŠTELAN-MACAN. M (2006)**

Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater, page 733-737. Talanta 70 (2006). 732–738.

**19. BABIC S, MUTAVDZIC D, ASPERGER D, HORVAT A.J.M ET KASTELAN-MACAN.M (2004)**

Solid phase extraction and hplc determination of veterinary pharmaceuticals in waste water.

<HTTP://WWW.CID.CSIC.ES/EMCO/PDF%20ORAL/BABIC.PDF>

**20. BABIN. Y, FORTIER. S (2007)**

A Rapid SPE-Based Analytical Method for UPLC/MS/MS Determination of Aminoglycoside Antibiotic Residues in Bovine Milk, Muscle, and Kidney. JAOAC 90 (5) (2007) 1418–1426.

**21. BARBANÇON. J.M (2002)**

[Utilisation des antibiotiques, Restons vigilants](#)

Revue : La Santé de l'Abeille n°198, page 45-55.

**22. BARBANÇON. J. M (2001).**

[A propos des antibiotiques en usage apicole,](#)

La Santé de l'Abeille n°176, pp 113-117.

**23. BENETTI. C, DAINESE. N, BIANCOTTO. G, PIRO B. R, MUTINELLI. F (2004)**

Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping Development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. Analytica Chimica Acta, 520 (87–89).

**24. BEN YOUSSEF (2013)**

Résidus d'Antibiotique dans les DAOA et résistance bactérienne. Société scientifique de Médecine vétérinaire Aviaire. Page : 7,12 et 41.

**25. BERETTA. G, GELMINI. F, LODI. V et al (2010)**

Profile of nitric oxide (NO) metabolites (nitrate, nitrite and N-nitroso groups) in honeys of different botanical origin: nitrate accumulation as index of origin, quality and of therapeutic opportunities. J Pharm Biomed Anal. 2010; 53: 343-9.

**26. BERRAH. A (1984)**

Collection mathématique Université des sciences techniques Houarri Boumediene, 1<sup>ère</sup> édition, 1984.

**27. BEVERLEY. S, SHARMAN. M (2001)**

Improvement to the screening of antimicrobial drug residues in food by the use of Premi®Test. Research in Veterinary Science: Vol. 70; April 2001.

**28. BEZOEN, A., VAN HAREN, W. et HANEKAMP J.C. (1999).**

Human Health and Antibiotic Growth Promotors (AGPs): Reassessing the Risk. Heidelberg Appeal Nederland studies.

<http://www.stichting-han.nl/english/studies.html>

**29. BILLON. J (1981)**

Détection des antibiotiques dans le lait. Semaine vétérinaire. N° 203, p 7.

**30. BOATTO. G, CERRI. R, PAU. A, PALOMBA. M, PINTORE. G, GIOVANNA DENTI. M (1998).**

Monitoring of benzylpenicillin in ovine milk by HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 17, Août1998, p 733-738.

**31. BOGDANOV S, JURENDIC T, SIEBER R et al (2008)**

Honey for nutrition and health: a review. J Am Coll Nutr. 2008; 27: 677-89.mass spectrometric detection. AnalyticaChimicaActa, 520 (87-89).

**32. BOGDANOV. S, RUOFF. K, ODDO .PL (2004)**

Physico-chemical méthodes for the caractérisation of unifloral honeys. Apidologie 35. 17p.

**33. BOGDANOV. S (2003)**

Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products. APIACTA 38 (2003) 190-197.

**34. BOGDANOV. S, ET AL (1999)**

Honig Quality and International Regulatory Standards (1999) Review of the Work of the International Honey Commission. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 90, in press.

**35. BOGDANOV. S, MARTIN P. AND LÜLLMANN. C (1997)**

Harmonised methods of the European Honey Commission. Apidologie (extra issue) 1-59.

**36. BOGDANOV, S. (1996)**

Nouvelle législation suisse sur les denrées alimentaires. Revue Suisse d'apiculture, 93 (6) 200-205.

**37. BONFIGLIO. R, KING. R C, OLAH . T V, MERKLE. K (1999)**

The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. First published: 24 June 1999.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19990630\)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19990630)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0)

**38. BOTOGLOU. N.A, FLETOURIS .D.J, (2001)**

Anti-Bacterial Drugs: Drug Residues in Foods. Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 85–87.

**39. BOUCHARD. E (2004)**

Préparations pharmaceutiques pour la décontamination digestive : dosage et étude de stabilité des principes actifs des gélules administrées chez les adultes neutropéniques, page 48-50. Mémoire du diplôme d'études spécialisées de pharmacie industrielle et biomédicale. Mémoire N°26-2004. Université Claude Bernard – Lyon I faculté de pharmacie institut des sciences pharmaceutiques et biologiques.

**40. BOUCHONNET. S et LIBONG. D (2007)**

Le couplage chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse, page 2-24. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Ecole Polytechnique 91128 PALAISEAU Cedex.

<http://www.dcmr.polytechnique.fr/moyens/couplage.pdf>

(Consulté le 26-01-2008).

**41. BOURIN. M, LIEVRE. M et ALLAIN. H (1993)**

Cours de pharmacologie, 3<sup>ème</sup> éd, chapitre médicaments anti-infectieux, page 291-307.

**42. BROES. A, BOUTIN. R, et DELORME. M (1999)**

Utilisation des médicaments. Guide porc, comité production porcine, page 4  
[http://www.cdpqinc.qc.ca/Champs\\_dactivite/04Sante/references/Medicaments%20CPAQ%20final.pdf](http://www.cdpqinc.qc.ca/Champs_dactivite/04Sante/references/Medicaments%20CPAQ%20final.pdf) (Consulter le 25-02-2008).

**43. BROUILLET. P (2002).**

Résidus de médicaments dans le lait et tests de détection. Bulletin des. GVT n°15. Mai-Juin 2002, p 25-41.

**44. BROUILLET .P (1994)**

Maîtrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait. Recueil de médecine vétérinaire, n° 170, Juin-Juillet 1994, p. 443-454.

**45. BRUNEAU (2006)**

Antibiotique dans le miel : Pollution verticale/horizontale page 2-3/3.

**46. BURGOT. G et BURGOT .J-L (2002)**

Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. Éditions TEC & DOC p 26, 27.

**47. CAI Y, CHENG J, MOU S, YIQIANG L (2005).**

Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection. J. Chromatogr. A. 1085(1): 124-130.

**48. CALVARESE S, ANNA FRANCESCA F, GIAMPIERO S, GIANFRANCO D, (2006)**

Chloramphenicol in royal jelly: analytical aspects and occurrence in Italian imports. Apidologie 37 (2006) 673–678 c \_ INRA/DIB-AGIB/ EDP Sciences, 2006 DOI: 10.1051/apido:2006042.

**49. CAZEAU, G. Et Al (2010)**

Utilisation des antibiotiques par les éleveurs en filière bovine en France. In 17e Journées Rencontres Recherche Ruminants, 71–74. Disponible en ligne :

<http://www.journees3r.fr/spip.php?article2978>

**50. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUEBEC (CEAEQ), (2015)**

Protocole de validation d'une méthode d'analyse en chimie. Dépôt légal- Bibliothèque et archives nationales du Québec. ISBN: 978-2-550-72697-5 (PDF). P 9-15.

**51. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER), FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), (1994)**

Reviewer Guidance A., Validation of Chromatographic Methods.

**52. CHATAIGNER .B ET STEVENS. A (2005)**

Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées a DAKAR, p 12.

**53. 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, 2004, n°4019, 103p.

**54. CHATELLET. M-C (2007)**

Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, page 9-90. Thèse de docteur vétérinaire, École nationale vétérinaire d'ALFORT.

**55. CHEVIRON. N. A. ROUSSEAU. (2000)**

Coumarin-SER-ASP-LYS-PRO-OH, A Fluorescent substrate for Determination of Angioten<sin-coverting Enzyme Activity via High Performance Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry, 280, 58-64.

**56. CHOVELON. G (2015)**

Développement et validation d'une méthode de dosage de l'entécavir. Application pour l'étude de l'observance au traitement chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite b. mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale. Université Joseph Fourier faculté de pharmacie de Grenoble.

**57. CHULEEPORN. S, PILAIRUK. I, RENU. P & CHARTCHAI. K (2013)**

Development and Evaluation of a Screening Test Kit for Detection of Tetracycline Group Residues in Honey. CMU. J. Nat. Sci. (2013) Vol. 12(1). P 14-25.

**58. CINQUINA. A-L, LONGO. F, ANASTASI. G, GIANNETTI. L et COZZANI. R (2003)**

Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, page 228-232. Journal of Chromatography A, 987 227–233.

**59. CLARK, J (2009)**

Chemguide.

<http://www.chemguide.co.uk>

**60. CODEX ALIMENTARIUS (1999)**

Directives concernant la production, la transformation, l'étiquetage et la commercialisation des aliments issus de l'agriculture biologique. Page 4.

**61. CODEX ALIMANTARIUS (2009)**

Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires commission du codex alimentarius Trente-deuxième session Rome, Italie.

**62. COMMISSION EUROPEENNE (CE) (2010)**

Règlement (UE) N° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. *J. off. Union eur*, L 15, 1–72.

**63. COMMISSION EUROPÉENNE (2015)**

Rapport de la Commission au Parlement européen et au Conseil sur le fonctionnement du règlement (CE) n° 470/2009 du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) n° 2377/90 et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil. 2015. 20p.

**64. COMMISSION DECISION OF 13 MARCH 2003 AMENDING DECISION 2002/657/EC**

As regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) residues in food animal origin (2003/18/EC), *off. Eur. Commun.* L71 (2003).

**65. COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS (CAC) (2011)**

Liste des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. CAC, Rome, 36 pp.

**66. COMMISSION INTERNATIONALE DU MIEL (2012)**

Qualité du miel et normes internationales relatives au miel.

[http://www. Bee-hexagone.net/en/network.htm](http://www.Bee-hexagone.net/en/network.htm)

**67. COMMISSION INTERNATIONALE DU MIEL (2009)**

Harmonized methods of the international honey commission. Bee Product Science; 314:165-169P.

**68. COMMISSION REGULATION 1430/94 OF 22 JUNE 1994.**

Amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun., L156, 6 (1994).

**69. CONFERENCE INTERNATIONALE SUR L'HARMONISATION (ICH)**

Texte et méthodologie Q2(R1). 2005, pp 1-13. Off. J. Eur. Commun., L125, 10 (1996).

**70. COPPET. D.E ET BRUWER. H.B, (1959)**

Résidus des antibiotiques dans les aliments d'origine animale. Revue de médecine vétérinaire 1959 Tome 146 /N°2/P73-82.

**71. CORNELIS M ET JOURET M, (2001)**

Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires. P 3, 4.

**72. CORPET D.E. LUMEAU .S, ET CORPET.F (1989)**

Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. Antibiotic agent's chmother. /33:4, p 535-540.

**73. COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC OF 29 APRIL 1996**

Relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE.

**74. COUNCIL REGULATION 2377/90/ec,**

of 26 June 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Brussels, Belgium.

**75. COYNE. R, BERGH. Ø, SAMUELSEN. O-B (2004)**

One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytétracycline in fish muscle, Short communication, page 325-327. Journal of Chromatography B, 810 (2004) 325–328.

**76. CUQ. J-L (2008)**

Microbiologie alimentaire. Chapitre les agents antimicrobiens, page 125-130.

<http://diffusiondessavoirs.uomlr.fr/balado/wp-content/uploads/2007/10/poly-cours-bio-stia2-007.pdf> (Consulté le 05-02-2008).

**77. CUQ. J-L (2007)**

Chromatographie Liquide, page 4-48.

<http://diffusiondessavoirs.uomlr.fr/balado/wpcontent/uploads/2008/01/chromato-liquide-2007.pdf> (Consulter le 05-02-2008).

**78. DE BRABANDER. H.F, NOPPE. H, VERHEYDEN.K, VANDENBUSSCHE. J, WILLE. K, OKERMAN L.VANHAECKE. L, REYBROECK. W, OOGHE. S, CROUBELS. S, (2009)**

Review. Residue analysis:Future trends from a historical perspective. J. Chromatogr. A 1216: 7964-7976.

**79. DECISION DE LA COMMISSION EUROPEENNE (93/257/CEE),**

Arrêtant les méthodes de référence et la liste des laboratoires nationaux de référence pour la recherche de résidus. 14. 5. 93. Journal officiel des Communautés européennes.N0 L 118/75.

**80. DEVILLE M., DUBOIS N., PIRARD C., C. CHARLIER, (2013)**

Evaluation de l'effet matrice lors de l'analyse de stupéfiants par LC-MS-MS. Poster lors du 21<sup>ème</sup> congrès de la FSTA- 51<sup>ème</sup> congrès de la STC du 11 au 14 juin 2013.

**81. 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, 2002, 15, p191-196.

**82. DESCHAMPS.VC (1998)**

Production et commercialisation du miel thèse doc. vété .université Sabatier Toulouse p 118 ; *D'après mémoire : les maladies des abeilles domestique et leurs conséquences sanitaires en France. Présenté à l'université Claude Bernard Lyon 1.par : FREDERIC BERTRAN ; 2003 Page 124/190.*

**83. DEVIE. P, DIVOL. A, GILBERT. G, LAURENT. S, LE GOAZIOU. A, OLIVON. M et PETIT. J (2006)**

Les antibiotiques dans l'alimentation animale, page 1-30.

<http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Prod-Anim/antibio.pdf>

(Consulté le 12-12-2010).

**84. DEVIE P, DIVOL A, OLIVON M, GILBERT G, PETIT. J, LAURENT S ET LE GOAZIOU A (2005)**

Les antibiotiques dans l'alimentation animale p 13,14.

**85. DIAZ. TG, C A B A N I L L A S . A G , (1990)**

Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by High Performance Liquid Chromatography. Anal.Lett.23 (4): 607-616.

<http://dx.doi.org/10.1080/00032719008052468>

**86. DIRECTIVE 96/23 /CE, (1996)**

Relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/ CEE et les décisions 89/ 187/CEE et 91 /664/CEE. Journal officiel des Communautés européennes.

**87. DIRECTIVE DU CONSEIL (75/318/CEE),**

Du 20 mai 1975 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les normes et protocoles analytiques, toxico-pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de spécialités pharmaceutiques.

**88. DIRECTIVE (81/851/CEE)**

Du 28 septembre 1981 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux médicaments vétérinaires.

**89. DIBNER. J ET AL (2005)**

Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult Sci 84:634-43.

**90. DONADIEU. Y (2003)**

Qu'est-ce que le miel. Chapitre E. faculté de médecine de paris. 07 p.

**91. DUARTE A.C., CAPELO S., (2006)**

Application of Chemometrics in Separation Science,  
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29, 114-1176.

**92. DUCAUZE. C, BAILLET-GUFFROY. A ETBUI. T- X, (2016)**

Choix et validation d'une méthode d'analyse.

[https://www.agroparistech.fr/IMG/pdf/Choix\\_et\\_Validation\\_Methode-2.pdf](https://www.agroparistech.fr/IMG/pdf/Choix_et_Validation_Methode-2.pdf)

Consulter : le 21 octobre 2016

**93. DUMEN E, AKKAYA H, ÖZ GM, SEZGIN FH (2013)**

Microbiological and parasitological quality of honey produced in İstanbul. Turk J Vet Anim Sci (2013) 37: 602-607.

**94. DUMONTET. V, VAN HUNG, NGUYEN (2004)**

Cytotoxic Flavonoids and Pyrones from Cryptocarya obovate. Journal of Natural Products 67,858-862.

**95. DUVAL. J et SOUSSY. C-J (1990)**

Antibiothérapie (4<sup>ème</sup> édition), page 3-58.

**96. DZIEDZIC. E. (1988)**

Les résidus de médicaments vétérinaires anthelminthiques. Thèse de Doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 1988, n°99, 192.

**97. EDDER P ET ORTELLI D (2006)**

Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires : "De l'étable à la table" journées scientifique ccCTA (service de la protection de la consommation. GENEVE), p 14.

**98. EDDER P., COMINOLI A., CORVI C., (1998)**

Dosage de résidus de streptomycine dans le miel par HPLC avec postdérivatisation et détection fluorimétrique, Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 89, 369-382.

**99. ELOIT. M (2004)**

Plan de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les viandes d'animaux de boucherie, de volailles, de gibiers, de lapins et de poissons d'élevage, page 2. IMG/pdf/dgaln20068240z-3.pdf (Consulter le 20-04-2008).

**100. ELZEN, P. J. WESTERVELT, D. CAUSEY, D. ELLIS, J. HEPBURN, H. R. (2002)**

2AND P. Neumann Usdaðars, kika de la Garza Subtropical Agricultural Research Center, 2413 E. Highway 83, Weslaco, TX 78596 Method of Application of Tylosin, an Antibiotic for American Foulbrood Control, with Effects on Small Hive Beetle (Coleoptera: Nitidulidae) Populations - J. Econ. Entomol. 95(6): 1119Ð1122.

**101. EMSEN. IM (2007)**

A different and safe method of split thickness skin graft fixation: Medical honey application. Burns 2007; 33:782-787.

**102. ESPINASSE. L, AGRIMER. F, FRANCOIS. M, LESCOP. M, MAHAUT. B, RIGAL. G (2011)**

Guide d'utilisation des kits immunoenzymatiques format microplaques (kits ELISA). IRTAC (Institut de Recherches Technologiques Agro-Alimentaires des Céréales), p 4-23.

**103. ETERAF-OSKOU EI T, NAJAFI M (2013)**

Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. Iran J Basic Med Sci; 2013; 16: 731-742.

**104. EURACHEM, (1998)**

The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory guide to method validation and related Topics, Eurachem, Teddington, Middlesex, UK, 1998.

**105. EUZEBY. J.P (2007)**

Abrégé de bactériologie générale et médicale.

<http://www.fougeres.afssa.fr/>

(Consulté le : 12-01-2008)

**106. FABRE.J.M (2006).**

Comprendre et prévenir Les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. p 4.

**107. FABRE. J.M, LEPOUTRE. D (2002)**

Changement de méthode de détection des inhibiteurs : les conséquences pour les vétérinaires et les éleveurs. Bulletin des GVT, n°15. Avril-Mai-Juin 2002, p 33-34.

**108. FEINBERG. M (2009)**

Guide de validation des méthodes d'analyse; Lavoisier Edition Tec & Doc 2009.

**109. FEKETE, S., FEKETE, J., MOLNAR, I. GANZLER, K. (2009)**

Rapid high performance chromatography method development with high prediction accuracy, using 5 cm long narrow bore columns packed with sub-2 µm particles and design space computer modeling. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7816-7823.

**110. FERRANDO (1966)**

Influence sur la santé de l'homme des additifs alimentaires dans la ration des animaux de ferme. Bulletin de l'INSERM N°2 1966, P191-218.

**111. FLEISS J.L (1981)**

Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

**112. FONTAINE. M (1992)**

Vade-mecum du vétérinaire, formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène, 15<sup>ème</sup> éd, page 106-119. Volume 1.

**113. FRESNAY. E (2013)**

La disponibilité du médicament vétérinaire en apiculture : identification des difficultés et des solutions. *Santé des abeilles : état des connaissances et perspectives pour la recherche, Rencontres scientifiques de l'Anses*. Auditorium Siège de l'Anses, le 21 novembre 2013.

**114. FRITZ. J.W et ZUO. Y (2007)**

Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. **105**(3), p 1297-1301.

**115. FURUSAWA. N, (2003)**

Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent, page 155-159. *Talanta* 59 (2003) 155\_/159.

**116. GAJDA. A, POSYNIAK. A, AND PIETRUSZKA. K, (2008)**

Analytical procedure for the determination of doxycycline residues in animal tissues by liquid chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy* 52, 417-420, 200.

**117. GALLINA.A, BENETTI.C, BIANCOTTO.G, BAGGIO.A, MANZINELLO.C DAINESE.N, MUTINELLI. F (2005).**

Antibiotics residues in honey: validation procedure. *APIACATA*, N°40, p45-49.

**118. GAUDIN V, DE COURVILLE A, HEDOU C, RAULT A, DIOMANDE SE, CREFF-FROGER C, VERDON E (2013)**

Evaluation and validation of two microbiological tests for screening antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. *Food Addit Contam Part A. Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2013; 30 (2):234-43.

**119. GAUDIN. V, A. RAULT, A. DE COURVILLE, C. HEDOU, S. DIOMANDE, C. CREFF-FROGER, E. VERDON, (2012)**

Validation of 2 microbiological tests for the screening of antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. *Euroresidue VII*, Egmond M/%aan zee (The Netherlands), Mai 2012.

**120. GAUTHIER. E (1993)**

[Les antibiotiques : l'envers du miracle](#), *L'Agora*, vol. 1, no 3.

**121. GEERTSEN. G, AND. PEDERSEN. B, (2009)**

Determination of residual tetracyclines in honey by HPLC-UV; Optimizing and validation. p. 460-464. In L.A. van Ginkel and A. Ruiters (eds) *Proceedings of Euroresidue IV Conference*. Residues of Veterinary Drugs in Foods; Veidhoven, the Netherlands.

**122. GHASHGHAIE. J, M DURANCEAU (2001)**

$\delta^{13}\text{C}$  of  $\text{CO}_2$  respired in the dark in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought Plant, Cell and Environment, 24, 505-515.

**123. GHELDOLF N, WANG XH, ENGESETH NJ (2002)**

Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. J Agric Food Chem. 2002; 50: 5870-7.

**124. GOMEZ-JIMENEZ . S, ESPINOSA-PLASCENCIA . A, VALENZUELA-VILLA . F, BERMUDEZ-ALMADA. M (2008).**

Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment, page 23-28. Aquaculture 274 (2008) 24–29.

**125. GOGNY. M, PUYT. J-D (2001)**

Classification des principes actifs, page 2-6. Editions le point vétérinaire.

**126. GOGNY. M, PUYT. J-D, PELLERIN. J-L (2001)**

Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, page 165-168. Editions le point vétérinaire.

**127. 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).

[http://www.cndwebzine.hcp.ma/cnd\\_si/MG/pdf/35821/35822pdf](http://www.cndwebzine.hcp.ma/cnd_si/MG/pdf/35821/35822pdf).

(Consulter le 20-01-2008).

**128. GUY. P A, ROYER.D, MOTTIER .P, GREMAUD. E, PERISSET.A, STADLER. R H (2004)**

Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1054, 365–371.

**129. HAMMEL YA, MOHAMED R, GREMAUD E, LEBRETON MH, GUY PA (2008)**

Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1177:58–76.

**130. HANZEN. C (2008)**

La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Approche individuelle Année 2007-2008 [http://eap.mcgill.ca/AgroBio/ab\\_head.htm](http://eap.mcgill.ca/AgroBio/ab_head.htm) date de consultation : 14/07/2013.

**131. HELIO. A, MARTINS. J, TEREZA. A, KUSSUMI. A, WANG. D, LEBRE. T (2007).**

A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. J. Bra. Chem. Soc. 18(2): 52-71.

**132. HELLALI A. K (1999)**

Pharmacologie fondamentale et clinique à l'usage des étudiants en médecine. ENAG édition. p 135.

**133. HOLMBERG .S D (1987)**

Antimicrobial resistance: a review of health and economic impacts. *APUA, Newsletter*, V4, p1-8.

**134. HORN, H. UND LÜLLMANN, C. (1992)**

Das grosse Honigbuch, Ehrenwirth, München.

**135. HUBERT PH., NGUYEN-HUU J.**

**J., BOULANGER B., CHAPUZET E., CHIAP P., COHEN N.,  
COMPAGNON P.A., DEWE W., FEINBERG M., LALLIER M., LAURENTIE M., MERCIER  
N., MUZARD G., NIVET C., VALAT L., (2003)**

Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches  
Commission SFSTP, STP Pharma Pratiques - volume 13 – N°3 – (mai/juin 2003).

**136. JACOB. V (2010)**

La chromatographie liquide haute performance. UIT de chimie de Grenoble. Date de mise en ligne  
: mercredi 20 janvier 2010.

**137. JANVIER. P, (2010)**

Cours de spectrométrie de masse de master ACBPI. chap XXX.

**138. JEANTET .R, CROGUENEC .T, SCHUCK .P, ET BRULE .G (2007)**

Science des aliments, Edition Tec et Doc, volume 2 p27, 32.

**139. JEAN-PROST P, (2005)**

L'apiculture connaître l'abeille conduite le rucher. 7<sup>ème</sup> édition.

**140. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requi  
rements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of  
Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland, 2005.**

**141. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH), (1994)**

Guideline of Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (r1). P 1-17.

**142. INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION (ISO), (2000)**

ISO17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO,  
Geneva, Switzerland (2000).

**143. INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION (ISO), (1994)**

**ISO 5725-1:** Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1:  
General principles and definitions. Reviewed and confirmed in 2012.

**144. KEBIR. A, (2016)**

Les résidus d'antibiotiques: de l'étable à la table. Laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem.

**145. KECK .G a (1978)**

Métabolisme des médicaments et des toxiques 1-L'absorptions. Le point vétérinaire vol .7.n 35  
septembre.

**146. KECK .G b (1978)**

Métabolisme des médicaments et des toxiques 2-La distribution. Le point vétérinaire vol .7.n 35 septembre.

**147. KECK .G c (1978)**

Métabolisme des médicaments et des toxiques 3-La biotransformations. Le point vétérinaire vol .7.n 35 septembre.

**148. KECK .G d (1978)**

Métabolisme des médicaments et des toxiques 4-L'élimination. Le point vétérinaire vol .7.N° 35 septembre.

**149. KHATEREH KHORSANDI, REZA HOSSEINZADEH, (2013)**

Determination and comparison of major polyphenol of four red fruits using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences. 2013/14: 3 (3) 250-252.

**150. KILINC B, CAKLI. S (2008)**

Screening for antibiotic residues in the trout by the four plate test, Premi test and ELISA test. Eur. Food Res Technol. 2008; 226:795799.

**151. KLEMENTZ. D, PESTEMER. W (1996)**

Extraktion, clean-up und HPLC - Bestimmung von streptomycin in Apfel-, Honig- und Nektarproben. - erste ergebnisse aus freilandversuchen., Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 48, 280-284.

**152. KOCHER. U, (1996)**

Nachweis von Streptomycin-Rückständen in Honig mittels Charm II Test und Absicherung der Befunde durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion, Lebensmittelchemie 50, 115-117.

**153. KÖLBENER. P ET AL (2005)**

Manuel suisse des denrées alimentaire résidus de médicament vétérinaire page5/23 .Les différents calculs du temps d'attente *Le Point Vétérinaire*, 2001, 32, (212), p48 51. D'après : Mémoire *les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale évaluation et maîtrise de ce danger* Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I2008 par Slotz Remi.

**154. KOLUMAN A, MELIKOĞLU B, DERIN O, OKOK S, ANNIBALLI F (2013)**

Clostridium botulinum in honey: prevalence and antibiotic susceptibility of isolated strains.

Turk J Vet Anim Sci (2013) 37: 706-711.

**155. KONIG. C ET AL (1998)**

Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid--implications for bactericidal activity of antibiotics. J. Antimicrob Chemother **42**:227-32.

**156. KORSRUD G.O ET AL (1998)**

Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial Veterinary Drug Residues in Slaughtered Animals ». Journal of AOAC International 81, 1, 21-24.

- 157. KRINGLE R.O., (1994)**  
An assessment of the 4-6  
20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies, *Pharmaceutical Research*, 11, 556-560.
- 158. LAGIER. G (1998)**  
Pharmacologie fondamentale et clinique, 7<sup>ème</sup> Ed, p76.
- 159. LAVALLAZ. P et DELETROZ. R (1994)**  
Chromatographie, page 1-14.  
<http://www.etudiants.ch/upload/documents/superuser/chromatographie.pdf>. (Consulter le 10-2-2008).
- 160. LAURENTIE. M, SANDERS. P (2002)**  
Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 15, p197-201.
- 161. LA VIGNE .JP (2007)**  
Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance, B6 – Antibiotiques et résistance. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes, p 123.
- 162. Le BIHAN. J.Y, Le MASSON. J.P (2008)**  
Chromatographie liquide haute performance ou H.P.L.C  
<http://www.iut-lannion.fr/LEMEN/Mpdoc/CHIMIE/Chimie1/CHROMATO.HTM>.  
(Consulter le 08-02-2008).
- 163. LECHAT.P (1975)**  
Abrégés de pharmacologie médicale, 2<sup>ème</sup> Ed, p 85, 86.
- 164. LECHAT.P (2007)**  
Pharmacologie, Service de pharmacologie Université Paris-VI, DCEM1., p307.
- 165. LEE. H. S, (2000).**  
HPLC analysis of phenolic compounds. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Food analysis by HPLC* (2nd ed). New York: Marcel Dekker Inc.
- 166. LEROY.P et FARNIR.F (2006)**  
Méthodes statistiques en médecine vétérinaire. Faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège. P 133-49.
- 167. LINLING. W, YANG. H, ZHANG. C, MO. Y, LU. X (2008)**  
Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica chimica acta* xxx.

**168. LOMBARDO-AGUI M., GARCIA-CAMPANA A.M., GAMIZ-GRACIA L. AND CRUCESBLANCO C., (2012)**

Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta* 2012 93:193-199.

**169. LOPEZ MI, PETTIS JS, SMITH IB, CHU PS (2008)**

Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *J Agr Food Chem* 56:1553–1559.

**170. LÓPEZ AC, ALIPPI AM (2007)**

Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey.

*Int J Food Microbiol.* 2007 Jun 30; 117(2):175-84. Epub 2007 Mar 30.

**171. MAGHUIN. M (2002)**

Hormones, substances anabolisantes et résidus de traitements vétérinaires en relation avec la sécurité alimentaire In: Sécurité alimentaire du consommateur, 2ème.Ed. TEC & DOC, Lavoisier. p 65-91.

**172. MAGHUIN-ROGISTER G (2005)**

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse I. Evolution de la stratégie de contrôle. *Ann. Méd. Vét. , 149, 183-187.*

**173. MAILLARD. R (2002)**

Antibiothérapie respiratoire. *La Dépêche Vétérinaire* 80 (Suppl) : 15-17.

**174. MAJORS. R. E, PRZYBYCIEL. M (2002)**

Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases.

*LC GC North America, 20, 584-593.*

**175. MARCHAND. M, (2013)**

Comparaison des limites de détection déterminées par répétabilité et par reproductibilité. Rapport de l'institut national de santé publique du Québec.

Bibliothèque et archives nationales du Québec. ISBN : 978-2-550-68353-7. N° DE PUBLICATION : 1674. p 1-12.

**176. MARCOZ. N (2003)**

Étude de stabilité des solutions injectable d'amiodarone. Mémoire pour le travail de diplôme d'analyse pharmaceutique, université de Genève, p 10-11.

**177. MATUSZEWSKI B.K. ET AL., (2003)**

Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2003, 75, 3019-3030.

**178. MAUR. NEUMAN (1990)**

Vade-mecum des antibiotiques, 5<sup>ème</sup> édition.

**179. MAYOR. M, BOURRIE.G, (2010)**

Validation d'une méthode de chimie analytique Application au dosage des anions fluorure, chlorure, nitrite, bromure, nitrate, phosphate et sulfate par chromatographie ionique. Unité Géochimie des sols et des eaux – INRA. Numéro spécial 2010.

**180. MCGLINCHEY T A., RAFTER P.A., REGAN F., MCMAHON G. P., (2008)**

A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *analytica chimica acta* 624 (2008) 1–15.

**181. MCKELLAR. Q (2001)**

Pharmacokinetic and dosage regimen of antimicrobials. *Compte-rendu des actualités en buiatrie*, Paris, Société Française de Buiatrie.

**182. MERKEN.M & BEECHER. G. R, (2000)**

Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577–599.

**183. MESSOMO NDJANA. F (2006)**

Étude de la distribution et de la qualité des médicaments vétérinaires au Cameroun.

Thèse de doctorat de l'École inter-états des sciences et médecine vétérinaires de Dakar (EISMV), Sénégal, 114 pp.

**184. MEVIUS. D-J, RUTTER. J-M, HART. C-A, IMBERECHTS. H, KEMPF. G, LAFONT. J-P, LUTHMAN. J, MORENO. M-A, PANTOSTI. A, POHL. P et WILLADSEN. C-M (1999)**

Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, page 1-57. Editions Le point vétérinaire.

**185. MICHAUD V (2005)**

Antibiotic residues in honey - the FEEDM view. *Apiacta* 40:52–54.

**186. MILHAUD .G (1978)**

L'utilisation rationnelle des médicaments vétérinaire et le temps d'attente, recueil médecine vétérinaire Tome 154/N° 02/p177-185.

**187. MILHAUD G., PERSON J.M, (1981)**

Evaluation de la toxicité des résidus d'antibiotiques dans le lait.

*Rec. Méd. Vét.*, 1981, 157, (2), p179-185

**188. MILHAUD .G ET PINAULT. L (1999)**

Législation de la pharmacie vétérinaire. Chapitre III : évaluation des médicaments vétérinaires : Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), limites maximales de résidus (LMR), page 25-40. Editions Le point vétérinaire.

**189. MOATS W.A, (1998)**

B-Lactams. In: *Analytical procedures for drug residues in food of animal origin*.

Edited by Turnipseed S.B., Long A.R. Science Technology System, West Sacramento, CA: 287-315.

**190. MONDEGUER. F, (2007)**

Validation d'un procédé automatisé d'extraction par SPE pour identifier et quantifier les dinophysistoxines en LC/ESI/SM/SM par piégeage d'ions. Mémoire rédigé dans le cadre d'une demande d'équivalence de Master à l'École Doctorale de Chimie-Biologie d'Angers.

**191. MORANCAIS M., (2010)**

Cours de chromatography liquide de master ACBPI chap 3 XXX.

**192. MORETAIN. J.P (2000).**

La recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait. Proceedings lait, qualité et santé, p 19-22.

**193. MOROVJAN. G, CSOKAN. P-P, NEMETH-KONDA. L (1998)**

HPLC Determination of Colistin and Aminoglycoside Antibiotics in Feeds by Post-Column Derivatization and Fluorescence Detection, page 32-36. Chromatographia Vol.48, No. 1/2, 32-05.

**194. NANETTI. A, BÜCHLER. R, CHARRIERE.J-D, FRIEDS.I, HELLAND.S, IMDORF.A, KORPELA.S, KRISTIENSEN.P (2003)**

Oxalic acide traitement for varroa control. APIACTA 38, 81-87.

**195. NOTE EXPLICATIVE CEE III/ 844/87, (1989)**

Note explicative européenne sur la validation analytique. Journal officiel des Communautés européennes.

**196. NICOLICH. R S, WERNECK-BARROSO. E, MARLICE A. MARQUES. S (2006)**

Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 565, 97–102.

**197. OKA. H, PATTERSON.J, (1995)**

Chemical analysis of tetracyclines. In *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*; Oka, H., Nakazawa, N., Harada, K., MacNeil, J. D., Eds.; AOAC: Gaithersburg, MD, 1995; pp 333-405.

**198. OLIVEIRA. R, DE PIETRO. A, CASS. Q (2006)**

Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup. Talanta n° 71, p 1233–1238.

**199. ORTELLI. D, EDDER. P ET CORVI. C (2004)**

Analysis of Chloramphenicol Residues in Honey by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Chromatographia, 59, January (No. 1/2).

**200. OSTROWSKI. T, JC MAURIZOT, MT ADELIN, JL FOURREY, P CLIVIO (2003)**

Sugar Conformational Effects on the Photochemistry of Thymidyl (3'-5') thymidine. Journal of Organic Chemistry 68, 6502-6510.

**201. OUDJET K (2012)**

LE MIEL, Une Denrée à Promouvoir. Infos-CACQE N°:00 / Octobre 2012, 1-3.

**202. PAIGE LT, MILLER M (1997)**

Public health impact on drug residues in animal tissues. *Veterinary and Human Toxicology* 9: 1–27. 1997.

**203. PAN.C, ZHANG.H, CHEN.S, XU.Y, AND. JIANG.S (2006)**

Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography-mass spectrometry after use of quechers clean up. *ACTA CHROMATOGRAPHICA*, NO: 17.

**204. PANAIVA.L (2006)**

Techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. Conférence Eurocopter, 1 juin 2006, Marseille, France.

**205. PENA. A (2007)**

Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Edible Swine Tissues by Liquid Chromatography with Spectrofluorometric Detection and Confirmation by Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55** (13), p 4973-4979.

**206. PENA, N. PELANTOVA,C. M. LINO,M. I. N. SILVEIRA,AND P. SOLICH (2005)**

Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3784-3788.

**207. PERSANO. O, L., PIAZZA, M. G, SABATINI.A. G, AND ACCORTI, M. (1995)**

Characterization of unifloral honeys. *Apidologie* 26, 453-465.

**208. PETITJEAN. P, HENIN. O, ELLIAS. S ET GRUAU. G, (2001)**

Application de l'électrophorèse capillaire au dosage des anions et des cations majeurs en solution dans les eaux douces naturelles. Rennes : Géosciences Rennes, 2001. 49 p. Cahiers techniques de Géosciences Rennes, 2. ISBN 2-914375-02-6.

**209. PHILLIPS. I Et Al (2004)**

Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* **53**:28-52.

**210. PIAZZA M.G., ACCORTI, PERSANO. M. E (1991)**

Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura* 7, 51-63.

**211. PILLY. E (2003)**

Maladies infectieuses 19<sup>ème</sup> édition. Édition 2M2 septembre 2003 France.

**212. PIRO.R, MUTINELLI. F (2003)**

The EU legislation for honey control. *APIACTA* 38, 15-20.

**213. PONTOH J, LOW NH (2002)**

Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from honeybees (*Apis mellifera*).

*Ins Biochem Mol Biol* 32: 679–690.

**214. POPELKA.P, NAGY.J, R. GERMUSKA.R, MARCINCAK.S, JEVINOVA.P, DE RIJK.A, (2005).**

Comparison of various assays used for detection of beta-lactam antibiotics in poultry meat. Food Additives and Contaminants.

**215. POUPAT. C I. HOOK, F. GUERITTE. (2000)**

Neutral and basic taxoid contents in the needles of *TAXUS* species. *Planta Medica*, 66, 580-584.

**216. PRANDL. O (1973)**

Les problèmes posés par l'emploi des hormones, des antibiotiques et autres substances pouvant laisser des résidus dans les produits carnés et laitiers. *Prat. Vét.*, 1973, 3, p33-3.

**217. PREMA, RAPURI (2003)**

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography. Macmillian reference .USA, p165-167.

**218. PUYT J.D (2004)**

Chimiothérapie générale. ENV, Nantes, P 1-38.

<http://ww.vet-nantes.fr/html/cours en ligne/>

**219. PUYT J.D (2002)**

Les antibiotiques et antimicrobiens de synthèse p2.

<http://ww.vet-nantes.fr/html/cours en ligne/>

**220. PUYT. J-D et GUERIN-FAUBLEE. V (2006)**

Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie. Ed 2006, page 1-27.

**221. QUINTANA-RIZZO.J SALTER.R SAUL.S (2005).**

Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin in honey. *APIACATA*, N°40, p55-62.

**222. REED. L-A, SIEWICKI. T-C, SHAH. J-C (2004)**

Pharmacokinetics of oxytétracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, page 12-27. *Aquaculture* 232 (2004). P 11 –28.

**223. RÈGLEMENT (CE) N° 470/2009**

du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil. *Journal Officiel*, 16/06/2009.

**224. RÈGLEMENT (UE) N° 37/2010 DE LA**

Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. *Journal Officiel*, 20/01/2010.

**225. REIG. M, TOLDRA. F (2008)**

Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, 2008, 78, (1-2), p60-67.

**226. RENAUD. D, (2012)**

Mise au point d'une méthode de dépistage des antibiotiques dans le miel par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Chimie analytique. 2012.

**227. REYBROECK. W, OOGHE. S, DE BRABANDER. H, DAESELEIRE. A (2007)**

Validation of the Tetrasensor Honey Test Kit for the Screening of Tetracyclines in Honey. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8359–8366.

**228. REYBROECK W, DAESELEIRE E, DE BRABANDER HF, HERMAN L (2012)**

Review: Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology* 158 (2012) 1–11.

**229. REYBROECK. W (2004).**

Résidus d'antibiotiques dans le lait : Utilisation des kits de dépistage des inhibiteurs. *Le Point Vétérinaire*, n° 242, Janvier-Février 2004, p 52-57.

**230. REYBROECK. (2003)**

Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. *APIACATA*, 38. p 23-30.

**231. REYBROECK. W (2000)**

Performance of the Premi®Test using naturally contaminated meat. Poster presented at Euro Residue IV, Veldhoven, the Netherlands, 810.

**232. RICHTER. D, BOGDANOV. S, EDDER. P (2005)**

*Revue Suisse d'apiculture* .126, (3), 2005, 20-25.

**233. RIUS A., RUISANCHEZ I., CALLAO M.P., RIUS F.X., (1998)**

Reliability of analytical systems: use of control charts, time series models and recurrent neural networks (RNN), *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 40, 1– 18 (1998).

**234. ROMNEE. J.M (2009)**

Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infra-rouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait, Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique, p 50-190.

**235. ROMNEE .J.M, RASKIN. P, ISTASSE. L, LALOUX. J, GUYOT. A (1999)**

Incidence des facteurs alimentaires sur l'obtention de résultats faux positifs lors de la détection des antibiotiques dans le lait par la méthode Delvotest SP. *Lait*, N°79. Inra/Elsevier, Paris, p 341-346.

**236. ROZET. E, (2008)**

Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2007-2008.

**237. SABATINI. A G, CARPANA. E, SERRA.G, COLOMBO .R (2003)**

Presence of acaricides and antibiotics in sample of italian honey .*APIACTA* 38. P46-49.

**238. SACHOT. E, PUYT. J-D (2001)**

Résidus médicamenteux. Les différents calculs du temps d'attente, page 2-5. *Point Vétérinaire* / N°212 2 / Janvier-Février /. Editions le point vétérinaire.

**239. SALGHI. R (2004)**

Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, ENSA Agadir.  
Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir p 7.

**240. SAMANIDOU. VF, NISYRIOU. SA, PAPADOYANNIS. IN (2007)**

Development and validation of an HPLC method for the determination of penicillin antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J Sep Sci.* 2007, n°30 (18), p 193-201.

**241. SANDERS, P. Et Al (2011)**

Utilisation des antibiotiques en élevages et enjeux de santé Publique. *INRA Prod. anim.*, 24 (2), 199–204.

**242. SANGLIER.S (2005)**

Cours Spectrométrie de Masse. Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio Organique UMR 7512 (Dir : Alain Van Dorsselaer) CNRS - Université Louis Pasteur Strasbourg.

**243. SAUNIER. C et GODIN. L (2013)**

Activité technologique en analyse biochimique, E.T.S.L paris, p. 5-50., <http://ligodin.free.fr>, date de consultation le 27/11/2010.

**244. SAUX M.C (2006)**

Pharmacocinétique et modalité d'administration des antibiotiques, p3.

**245. SCHELLINGER, A. P. & CARR, P. W. (2006)**

Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *Journal of Chromatography A*, 1109, 253-266.

**246. SCHNEIDER. M-J, BRADEN. S-E, REYES-HERRERA. I, DONOGHUE. D-J (2007)**

Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection, page 9 -12. *Journal of Chromatography B*, 846 (2007) 8–13.

**247. SCHWAIGER. I, SCHUCH. R, (2000)**

Bound sulfathiazole residues in honey - Need of a hydrolysis step for the analytical determination of total sulfathiazole content in honey, *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 96, 93-98.

**248. SCHWARZ, S. AND E. CHASLUS-DANCLA (2001)**

Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 32 (3-4): 201-25.

**249. SCHWARZ. S, C. KEHRENBURG, et al. (2001)**

Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. In *J Antimicrob Agents* 17 (6) : 431-7.

**250. SCHWEITZER. P (2005)**

Encore des miels hors norme. Laboratoire d'analyse et d'écologie apicole. 03p. *Revue l'abeille de France* N°872.

**251. SCIPPO. M L (2008)**

Introduction à la qualité et la sécurité des aliments.

[HTTP://WWW.ADAOA.ULG.AC.BE/](http://www.adaoa.ulg.ac.be/) P

**252. SCIPPO. ML, MAGHUIN-ROGISTER. G (2006)**

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse. Méthodes biologiques de dépistage. Ann. Méd. Vét., 150, 125-130.

**253. SEWLLAM T, MIYANAGA N, ONOZAWA M, HATTORI K, KAWARI K, SHIMAZUI T, AKAZA H (2003)**

Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. Int J Urol 2003; 10:213-219.

**254. SINCICH. T, (1996)**

Business Statistics by Example, 5th Edition. Prentice-Hall, Upper Saddle River.

**255. SOULSBY. L (2007)**

Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus.

J Antimicrob Chemother **60 Suppl 1**: 77-78.

**256. SOUVERAIN. S et al, (2004)**

Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chrom. A* **2004**, 1058, 61-66.

**257. SNYDER. L. R, KIRKLAND. J. J. & GLAJCH. J. L (1988)**

*Practical HPLC Method Development*. New York: John Wiley & Sons.

**258. STEAD, S. A., J. SHARMAN, A. J. TARBIN, E. GIBSON, S. RICHMOND, AND. STARK. , (2004)**

Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. Food Addition Contamination 21: 216-221. DOI: 10.1080/02652030310001647280.

**259. STOLZT. R (2008)**

Les résidus des antibiotiques dans les denrées d'origine animale.

Évaluation et maîtrise de ce danger. Université Claude Bernard Lyon 2008.

**260. SYLVIER. B (1984)**

Les résidus des antibiotiques dans le lait. Thèse Dr vétérinaire, institut des sciences vétérinaire de France 1984.

**261. THIERRY.B (2009)**

Cours de chromatographie liquide. Département de chimie, université de la Réunion.  
<http://www.uni-reunion.fr>

Date de consultation : 20/03/2012

**262. UMBER. J (2006)**

Cours de chimie organique, minérale et structurale.

<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/Physique/CHIM/Chromato01/chromato.pdf>

(Mise à jour le 26/03/2006)

**263. UNITED-STATES PHARMACOPEIA (USP), (1990)**

USP33-NF28 <1225> Validation of Compendial Procedures / General Information. P 1-5.

**264. US FEDERAL GOVERNMENT, GUIDANCE FOR INDUSTRY, (2001)**

Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Rockville, MD, USA, May 2001.

**265. VAN BRUIJNSVOORT. M, OTTINK. S. J.M, JONKER. K .M, DE BOER. E (2004)**

Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1058 (2004) 137–142.

**266. VERHNES. R, VANDAELE. E (2002)**

Détection rapide des inhibiteurs dans le lait. *Le point vétérinaire*, n° 227, Juillet-Août 2002, p 16-17.

**267. VERNIER. V ET AL (2008)**

Projet 48 dosage des tétracyclines dans le miel par différentes techniques d'analyse. P 9-10-18-20-22-23.

**268. VERZEGNASSI L., SAVOY-PERROUD M.C. AND STADLER R.H., (2009)**

Application of liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *Journal of Chromatography* 2002 977: 77-87. 13.

**269. VIDAL JL, LUIZ MA, GONZALEZ R, (2009)**

Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009). 57(5): 1760-1767.

**270. VINAS. P, BALSALOBRE. N, HERNANDEZ-CORDOBA. M (2007)**

Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods.

*Talanta* 72, 808–812.

**271. WAKI. K, OKUMURA.N, YAMAZAKI. M, (1992)**

Determination of tetracycline antibiotics by reversed phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 1992, 623, 153-158.

**272. WANG J, LI QX (2011)**

Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Adv Food Nutr Res.* 2011; 62: 89-137.

**273. WANG. I. H, MOORMAN. R. & BURLESON. J (2003)**

Isocratic reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of (S)-methoprene, MGK264, piperonyl butoxide, sumithrin and permethrin in pesticide formulation. *Journal of Chromatography A*, 983, 145-152.

**274. WANG J., LEUNG D., BUTTERWORTH F., (2005)**

Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53 (6) (2005) 1857–1865.

**275. WANG. Q, LIU. Q, LI .J (2004)**

Tissue distribution and elimination of oxytétracycline in perch *Lateolabrus janopicus* and black seabream (*Sparus macrocephalus*) following oral administration page 32-39. *Aquaculture* 237 (2004) 31–40.

**276. WIEST L., BULETE A., GIROUD B., FRATTA C., AMIC S., LAMBERT O., POULIQUENB H., ARNAUDGUILHEM C., (2011)**

Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2011 1218: 5743– 5756.

**277. WUTZ K, NIESSNER R, SEIDEL M (2011)**

Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays. *Microchim Acta* 2011, vol. 173, no1-2, pp. 1-9.

**278. YAHY (1997)**

L'antibiothérapie spécifique adaptée. Bertis Ed, p 9.

**279. YALA. D, MERAD A.S, MOHAMEDI. D, OUAR KORICH M.N (2001)**

Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.

**280. ZHEN YF, XIAO CX, LI XQ, CAI JN, HONG HH, FENXI HUAXUE, (2007)**

A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices, 35(9), 2007, 1290–1294.

**281. ZINEDINE. A, FAID. M, BENLEMLIH. M, (2007)**

Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique. *REMISE*, volume 1, n°1, p 1-9.

## **Listes des références anonymes**

### **282. ANONYME 1a (2012)**

Recueil des méthodes internationales d'analyses – OIV Résidus potentiellement allergéniques de protéines de collage dans le vin Méthode OIV- -MA- AS315-23 [www.oiv.int/...%204%20Methodes%20d%20analyses/.../OIV-MA-AS31...](http://www.oiv.int/...%204%20Methodes%20d%20analyses/.../OIV-MA-AS31...) date de consultation, 05-10-2013.

### **283. ANONYME 1b (2012)**

Le miel.

<http://www.01sante.com/contenu/page/miel-529>

### **284. ANONYME 2 (2008)**

Test à large spectre pour la détection de substances antimicrobiennes dans la

viande, page 1-2. Fiche de produit. DSM Nutritional Products. [www.premitest.com](http://www.premitest.com)

[http://www.dsm.com/en\\_US/downloads/premitest/PremiTest\\_ScreeningtestmeatFrans\\_DNP.pdf](http://www.dsm.com/en_US/downloads/premitest/PremiTest_ScreeningtestmeatFrans_DNP.pdf). (Consulter le 17-02-2008).

### **285. ANONYME 3 a (2007)**

Chapitre II : Chromatographies (TP02), page 1. Lycée La Merci.

[http://laroche.lycee.free.fr/barrandon/Spe\\_TS\\_physique/Fiche2\\_chroma.pdf](http://laroche.lycee.free.fr/barrandon/Spe_TS_physique/Fiche2_chroma.pdf). (Consulté le 17-12-2007).

### **286. ANONYME 3 b (2007)**

Chromatographie - Aspects Généraux, page 1-4.

[http://www.unige.ch/cabe/chimie\\_anal/chromato\\_notes.pdf](http://www.unige.ch/cabe/chimie_anal/chromato_notes.pdf)

(Consulté le 23-02-2008)

### **287. ANONYME 3 c (2007)**

Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, 1ère année. ENSA Agadir, page 1-26.

<http://www.ensa-agadir.ac.ma/gpee/download/chromatographie.pdf>.

### **288. ANONYME 4 (2006)**

Antibiotiques. Cours de Bactériologie Générale. Faculté de Médecine COCHIN-PORT-ROYAL, Université Paris.

<http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio1.html>

(Consulter le 11-02-2008).

**289. ANONYME 5 a (2005)**

Antibiothérapie 1 & 2, page 2-39.

<http://ifsi.ch-hyeres.fr/IMG/pdf/Antibiotherapie.pdf>

(Consulté le 11-12-2007).

**290. ANONYME 5 b (2005)**

Résidus de médicaments vétérinaires.

Manuel suisse des denrées alimentaires, chapitre 55. p 1-23.

**291. ANONYME 6 (2003)**

Antibiotiques. Les antibiotiques sont de précieux alliés à préserver, page 24-32.

<http://www.simv.org/Publications/Guide-Medicament/P24-32.pdf>

(Consulté le 10-03-2008).

**292. ANONYME 7 (2000)**

Aspects théoriques de la chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.), page 7-58. Document technique - association CIBAC - document technique. <https://iutcv.univ-paris12.fr/cibac/Annexes/CPG.pdf>.

(Consulté le 22-01-2008).

**293. ANONYME 8 (1998)**

Chromatographie. Lycée Louis Vincent – METZ, page 1-52.

<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/Physique/CHIM/Chromato01/chromato.pdf>.

(Consulté le 20-01-2008).