Université Yahia Fares Médéa
Faculté des Sciences
Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER en Sciences de la Nature et de la Vie**

**Option : Microbiologie Appliquée**

# Dont le thème est :

# « ETUDE CINETIQUE DE L'AMOXICILLINE TRIHYDRATE ET EVALUATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE SES RESIDUS DANS LE POULET FRAIS ET CUIT »

**Présenté par :** Bengherbia Rifka, Benkiar Selma et Bermak Nadera

**Soutenu le : 14 juillet 2021**

**Devant un jury composé de :**

| Nom | Grade | Lieu | Qualité |
|---|---|---|---|
| M. SALEM Sabiha | MAA | Université de Médéa | Présidente |
| Mme. BOUHERAMA Amina | MAA | Université de Médéa | Promotrice |
| M. Aines Mahfoud | MCB | Université de Médéa | Examinateur |
| M. SLAMA Houssam | / | Groupe SAIDAL | Co-promoteur |

**Promotion : 2020-2021**

# *Remerciements*

Notre travail a eu lieu au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université YAHIA FARES –MEDEA et le laboratoire de contrôle de qualité à SAIDAL, MEDEA.

Nous remercions chaleureusement en premier lieu notre promotrice et co-promoteur, **Mme. BOUHERAMA A.** et **M. SLAMA H.** pour leur disponibilité, patience, et encouragements. Merci pour leur accueil chaleureux au laboratoire et ses directives irremplaçables, mais aussi pour leur rigueur scientifique et conseils pertinents qui nous ont aidés à bien mener notre travail.

En second lieu, merci aux membres du jury, **Mme. SALEM S.** et **M. AINES M.** d'avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail, et d'avoir consacré de leur temps pour l'enrichir par leurs propositions.

En fin, nous tenons à remercier l'ensemble de personnel scientifique du SAIDAL MEDEA qui ont contribué à ce projet pour qu'il évolue jusqu'à sa forme finale.

*Un chapitre important de notre vie se termine avec la remise de ce manuscrit.*

# *Dédicaces*

*Tout d'abord, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir Accordé courage et bénédiction pour accomplir ce travail.*

*À mes très chers parents qui m'ont accompagné par leur aide, soutien et encouragement*

*À ma chère sœur, mes deux chers frères, mon cher mari et beau frère*

*À toutes les personnes de ma grande famille, à mes amies raounek et sarah, salma et nadera.*

*RIFKA*

*Je dédie ce travail en signe de respect et d'amour à mes très chers parents qui ont partagés mes joies et mes peines, et ont été toujours à mes côtés, et ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Que Dieu les garde toujours en bonne santé.*

*A mes chers frères, sœur ,et familles. A tous mes amies sans exception qu'ils soient proches ou loin surtout Soumia et Hassna . A mes chères binômes Rifka et Nadera que je souhaite tout le succès et le bonheur .*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*SELMA*

*Je dédie ce travail en signe de respect et d'amour à mes très chers parents. À mon très cher père pour tout son amour et soutien tout au long de mon parcours, à ma très chère mère pour tout son amour et sa tendresse débordante, pour leurs prières tout au long de mes études. Que Dieu les garde toujours en bonne santé. A mes chers frères. A tous ceux qui me sont chers.*

*NADERA*

# *Résumé*

Les aviculteurs utilisent des antibiotiques à titre préventif contre les infections, ils les utilisent aussi comme promoteurs de croissance afin d'augmenter le taux d'assimilation des aliments et de réduire l'incidence de la mortalité causée par des agents pathogènes. La présente étude vise à évaluer l'effet de la cuisson ménagère sur la stabilité et la cinétique de l'antibiotique « Amoxicilline trihydrate », fréquemment utilisé en élevage de poulet, à déterminer son influence sur le poids de poulet, à identifier et quantifier ses résidus dans le poulet frais et cuit, à étudier son inhibition après exposition à différentes températures, aussi à d'étudier la possibilité de dégradation de ces résidus dans le poulet par deux souches bactériennes.

L'influence de poids valorisé par le test *t* de student démontre que les sujets traités présentent une augmentation de poids significative par rapport aux sujets non traités.

Les résultats d'analyse par turbidimétrie montrent un trouble peu visible avec une valeur d'absorbance minime pour l'échantillon traité non cuit. Pour les échantillons traités cuits, les troubles remarqués sont plus denses et ont des valeurs d'absorbance qui changent au fur et à mesure que la température et le type de cuisson change.

L'analyse des échantillons par HPLC dévoile une transformation de la totalité de la molécule dans les échantillons cuits et non-cuits en autres produits, aussi une diminution de la quantité initiale de produits de dégradation de 28% pour l'échantillon cuit à 150 °C et de 34% pour l'échantillon cuit à 1200 W dans la microonde.

L'étude de la cinétique de l'antibiotique objet d'étude par la méthode de diffusion sur agar montre que l'inhibition de la molécule diminue quand elle est chauffée au-delà de la température ambiante (25°C). Un chauffage à 75 °C pendant 30 minutes entraine la réduction de l'effet inhibiteur de la molécule de 37% et de 46% à 90 °C pendant 15 minutes.

Concernant la dégradation des résidus par des souches bactériennes, *E. coli* a présenté une multiplication plus importante en présence des résidus d'amoxicilline que la souche *Paenibacillus phocaensis*,



**Mots clés :** antibiotiques, HPLC, turbidimétrie, cuisson, amoxicilline, poulet, résidus.

# *Abstract*

Poultry farmers use antibiotics as a preventive measure against infections, they also use them as growth promoters to increase the rate of food assimilation and reduce the incidence of mortality caused by pathogens. The present study aims to evaluate the effect of home cooking on the stability and kinetics of the antibiotic "Amoxicillin trihydrate", frequently used in chicken farming, to determine its influence on chicken weight, to identify and quantify its residues in fresh and cooked chicken, to study its inhibition after exposure to different temperatures, also to study the possibility of degradation of its residues in the chicken by two bacterial strains.

The influence of weight valued by the student's t test demonstrates that the treated subjects show a significant increase in weight compared to the untreated subjects.

Turbidimetric analysis results show little turbidity with minimal absorbance value for the uncooked positive sample. For the cooked positive samples, the turbidity noted is clearer and have absorbance values that change as the temperature rise.

Analysis of the samples by HPLC reveals a transformation of the entire molecule in the cooked and uncooked samples into other products, also a decrease in the initial amount of degradation products by 28% for the sample cooked at 150 ° C and 34% for the sample cooked at 1200 W in the microwave.

The study of the kinetics of the antibiotic under study by the agar diffusion method shows that the inhibition of the molecule decreases when it is heated above room temperature (25 ° C). Heating at 75 ° C for 30 minutes reduces the inhibitory effect of the molecule by 37% and by 46% at 90 ° C for 15 minutes.

Regarding the degradation of residues by bacterial strains, *E. coli* showed a greater multiplication in the presence of amoxicillin residues than the *Paenibacillus phocaensis* strain,



**Keywords:** antibiotics, HPLC, turbidimetry, cooking, amoxicillin, chicken, residues.

# ملخص


يستخدم مزارعو الدواجن المضادات الحيوية كإجراء وقائي ضد العدوى، كما يستخدمونها كمحفزات للنمو لزيادة معدل استيعاب الطعام وتقليل معدل الوفيات الناجمة عن مسببات الأمراض. تهدف الدراسة الحالية إلى تقييم تأثير الطبخ المنزلي على ثبات وحركية المضاد الحيوي "أموكسيسيلين ثلاثي الهيدرات" المستخدم بكثرة في تربية الدجاج لمعرفة تأثيره على وزن الدجاج، للتعرف وقياس تركيز بقاياه الراسخة في لحم الدجاج النيء والمطبوخ، دراسة تثبيطه بعد تعريضه لدرجات حرارة مختلفة، وكذلك إلى دراسة إمكانية استهلاك بقاياه الراسخة في لحم الدجاج بواسطة سلالتين من البكتيريا.

يوضح تأثير الوزن الذي يقدّره الاختبارt student أن الصيصان الذين تمت معالجتهم يظهرون زيادة كبيرة في الوزن مقارنة للصيصان غير المعالجة.

تظهر نتائج تحليل قياس العكورة عكورة غير واضحة مع قيمة امتصاص دنيا للعينة المعالجة غير المطبوخة. بالنسبة للعينات المطبوخة المعالجة، تكون العكورة الملحوظة أكثر وضوحًا ولها قيم امتصاص تتغير مع تغير درجة الحرارة ونوعية الطهي.

يكشف تحليل العينات بواسطة HPLC عن تحول الجزيء بأكمله في العينات المطبوخة وغير المطبوخة إلى مواد أخرى، وكذلك انخفاض في الكمية الأولية لمنتجات التحلل بنسبة 28٪ للعينة المطبوخة عند 150 درجة مئوية و34٪ للعينة مطبوخ على 1200 واط في الميكروويف.

تظهر دراسة حركية المضاد الحيوي قيد الدراسة بواسطة طريقة الانتشار الهلامي أن تثبيط الجزيء يقل عندما يتم تسخينه فوق درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية). التسخين عند 75 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة يقلل من التأثير المثبط للجزيء بنسبة 37٪ وبنسبة 46٪ عند 90 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة.

فيما يتعلق بتحلل البقايا الراسخة بواسطة السلالات البكتيرية، أظهرت *E. coli* تكاثرًا أكبر في وجود بقايا أموكسيسيلين من سلالة *Paenibacillus phocaensis*.



**الكلمات المفتاحية:** مضادات حيوية ، حركية ، طبخ ، أموكسيسيلين ، دجاج ، بقايا.

# *Liste des tableaux*


| N° | Titre de tableau | Page |
|---|---|---|
| **I** | Comparaison entre la composition chimique (par 100 g) de veau (viande rouge) et de poulet (viande blanche) | 9 |
| **II** | Comparaison entre la teneur en AGS et AGI (% de totalité en matières grasses) de veau (viande rouge) et de poulet (viande blanche) | 10 |
| **III** | Familles d'antibiotiques | 14 |
| **IV** | Limites maximales des résidus **(**LMR) et délais d'attente (DA) de quelques antibiotiques utilisés en filière aviaire | 17 |
| **V** | Caractéristiques chimiques de l'amoxicilline | 24 |
| **VI** | Plan d'échantillonnage | 28 |
| **VII** | Gradient de la phase mobile | 32 |
| **VIII** | Proportions de préparation des deux témoins *Escherichia coli et Paenabacillus phocaensis* (Milieu de culture : Bactérie v/v) | 35 |
| **IX** | Proportions après ajout d'*E.coli* (Milieu de culture : Echantillon : *E.coli* v/v) | 35 |
| **X** | Proportions après ajout de *Paenibacillus* (Milieu de culture : Echantillon : *Paenibacillus* v/v) | 35 |
| **XI** | Effet de l'amoxicilline sur le poids des poussins | 38 |
| **XII** | Détermination de la densité optique des solutions après 5h d'incubation | 40 |
| **XIII** | Temps de rétention relatifs aux composés détectés dans les échantillons | 45 |
| **XIV** | Données nécessaires pour le calcul des concentrations des produits de dégradation dans chaque solution | 46 |
| **XV** | Concentrations des produits de dégradations en (µg/mg) de l'amoxicilline et leur variation (%) | 47 |
| **XVI** | Variations des diamètres des zones d'inhibition en fonction de la température et du temps | 51 |

# *Liste des figures*


| N° | Titre de figure | Page |
|---|---|---|
| **1** | Différentes cibles des antibiotiques | 13 |
| **2** | Etapes clés du devenir d'un médicament dans l'organisme | 16 |
| **3** | Représentation schématique de la technique spectrophotométrique | 21 |
| **4** | Représentation schématique du principe chromatographique | 22 |
| **5** | Poussins sujets d'éxperience | 25 |
| **6** | Différentes étapes de l'extraction de jus de viande | 29 |
| **7** | Etapes préparatives (ensemencement et incubation) des échantillons avant la lecture | 30 |
| **8** | Schéma représentatif de system HPLC | 31 |
| **9** | Une microplaque | 34 |
| **10** | Aspect du milieu de culture avant et après incubation | 39 |
| **11** | Chromatogramme obtenu après analyse de la solution d'étalon | 41 |
| **12** | Chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (-) | 42 |
| **13** | Chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (+) | 42 |
| **14** | Chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (+) $_{120}$ | 43 |
| **15** | Chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (+) $_{150}$ | 43 |
| **16** | Chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ | 44 |
| **17** | Chromatogramme obtenu après injection du tampon pH 5 | 44 |
| **18** | Diamètres des zones d'inhibition de la solution témoin et des solutions chauffées obtenues après incubation. | 50 |
| **19** | Evolution de croissance de *Paenibacillus phocaensis* en milieu TSB en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 24h d'incubation | 54 |
| **20** | Evolution de croissance de *E. coli* en BN en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 24h d'incubation | 55 |
| **21** | Evolution de croissance de *Paenibacillus phocaensis* en milieu TSB en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 72h d'incubation | 57 |
| **22** | Evolution de croissance de E.*coli* en BN en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 72h d'incubation | 58 |

# *Abréviations*

**ADN :** acide désoxyribonucléique

**AGS :** acides gras saturés

**AGI :** acides gras insaturés

**AMO:** amoxicilline

**ARN :** acide ribonucléique

**CEE :** communauté économique européenne

**LC-MS** : chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse

**HPLC :** chromatographie en phase liquide à haute performance

**DA :** délai d'attente

**ELISA :** enzyme-linked immunoassay

**FAO:** food and agriculture organization

**LMR** : limite maximale de résidus

**OMS :** organisation mondiale de la santé

**ONAB:** office national des aliments du bétail

**UE :** union Européenne

**UV :** rayonnement ultraviolet

**UHT** : ultra-haute-température

# *Sommaire*

**Remerciement**
**Dédicace**
**Résumé en français**
**Résumé en anglais**
**Résumé en arabe**
**Liste des tableaux**
**Liste des figures**
**Abbreviations**
**Sommaire**

**Introduction** **1**

**Rappel bibliographique** **4**

**I. La filière avicole** **5**

**1. Secteur avicole en Algérie** **6**

**II. La viande** **7**

**1. Définition** **7**

**2. La volaille** **8**

**III. Les antibiotiques** **10**

**1. Définition et origine** **10**
**2. Utilisation** **11**
**3. Spectres d'activité** **11**
**4. Mécanismes d'action** **12**
**5. Familles d'antibiotiques** **13**
**6. Usage des antibiotiques en élevage aviaire** **15**
**7. Les risques sanitaires potentiels liés aux résidus des antibiotiques** **15**

**IV. Méthodes de dépistage et de quantification des résidus d'antibiotiques** **19**

**1. Tests d'inhibition microbienne** **19**

**2. Kits de tests rapides** **19**

**3. Turbidimétrie** **20**

**4. Méthodes quantitatives confirmatoires** **21**

**Matériel et méthodes** **23**

**I. Matériel** **24**

**1. Matériel non biologique** **24**

**2. Matériel biologique** **25**

**II. Méthodes** **36**

**1. Mise en place du dispositif expérimental** **26**

**2. Effet de l'amoxicilline sur la variation de poids** **26**

**3. Echantillonnage** **27**

**4. Recherche des résidus de l'amoxicilline** **28**

**5. Identification et quantification des résidus d'amoxicilline** **31**

**6. Etude de la cinétique de l'amoxicilline par diffusion sur agar** **33**

**7. Evolution de la biomasse bactérienne** **34**

**Résultats et discussion** **37**

**I. Effet de l'amoxicilline sur la variation de poids** **38**

**II. Recherche des résidus de l'amoxicilline** **39**

**III. Identification et quantification des résidus par HPLC** **41**

**1. Identification** **41**

**2. Quantification des résidus** **46**

**IV. La cinétique par diffusion sur Agar** **49**

**V. Evolution de la biomasse bactérienne** **52**

**Conclusion** **58**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# INTRODUCTION

Pour faire face aux besoins alimentaires des populations au cours des dernières décennies, l'élevage avicole a été facilité par l'utilisation de médicaments vétérinaires ; notamment les antibiotiques. Les antibiotiques sont utilisés à titre curatif, appliqué individuellement ou collectivement aux animaux atteints d'infections bactériennes, ou comme traitement préventif contre l'apparition de certaines maladies infectieuses, voire, dans des cas extrêmes, pour compenser une mauvaise hygiène de production (Baquero et *al*. 2010). Environ 80% des animaux destinés à la consommation reçoivent des antibiotiques pendant au moins une partie de leur période d'élevage. Les molécules les plus couramment utilisés sont les β-lactames, les tétracyclines, les aminosides, les macrolides, et les sulfamides (Lee et *al*. 2001). Après leur administration, ces traitements laissent des résidus dans les tissus et les produits qui en sont dérivés (Wassenaar 2005).

La présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale, associée au non-respect des instructions d'administration (posologie et délai d'attente) ou à de mauvaises pratiques d'élevage, peut être à l'origine de nombreux problèmes de santé chez l'homme. Ces problèmes comprennent des effets toxiques, une apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques, des effets immunopathologiques, une cancérogénicité (la sulfaméthazine, l'oxytétracycline et la furazolidone), une mutagénicité, une néphropathie (la gentamicine), une hépatotoxicité, des troubles de la reproduction, une toxicité médullaire (le chloramphénicol) et des allergies (la pénicilline) (Nisha 2008). La résistance aux antibiotiques est d'une importance thérapeutique primordiale. Bien qu'une telle résistance (qui touche les β-lactames surtout) (Wright 2005), soit connue pour impliquer une dégradation par hydrolyse enzymatique, les détails de ce qui se passe ensuite restent flous. Une étude a pu confirmer que certaines espèces telluriques ont tendance d'utiliser les antibiotiques comme source de nutriments essentiels pour leur survie (Crofts 2018). Les résidus d'antibiotiques sont mesurés de manière procédurale sur la chair non cuite, sauf que la plupart de la viande subit un traitement supplémentaire (cuisson, appertisation, ajout d'additifs alimentaires, etc.) avant consommation dans le but d'augmenter l'appétence et la durée de conservation (Ibrahim et *al*. 1994 ; Rose1998 ; Fae 2019. Étant donné que la plupart des types d'aliments sont cuits avant d'être consommés, il faut donc chercher plus d'informations sur l'effet de la cuisson sur les résidus, afin de donner une estimation plus précise de l'exposition de consommateur à ces produits chimiques et à tout composé issu de leur dégradation.

La gravité des conséquences évoquées ci-dessus nous a interpellé pour étudier les effets de diverses procédures de cuisson ordinaires sur le devenir (quantitatif et qualitatif) des résidus de

l'amoxicilline dans la viande de poulet, pour effectuer une cinétique de la molécule en question, dans le but d'évaluer son activité antimicrobienne après traitement thermique à différentes températures, aussi pour tester la possibilité que ses résidus soient exploités, par les bactéries, comme source de nutriments et d'énergie.

Cette étude a pour but d'étudier l'influence de la chaleur sur la stabilité d'un antibiotique fréquemment utilisé en élevage avicole, cela consiste à administrer d'une façon intentionnelle l'amoxicilline dans des poulets et procéder à l'abattage sans respecter le délai d'attente ; les échantillons sont ensuite traités par différents types de cuissons ménagère. Les résidus résultants dans la chair sont détectés et quantifiés par deux méthodes analytiques : turbidimétrie et HPLC. Pour affirmer nos résultats, on a établi une cinétique (par méthode microbiologique classique) de l'amoxicilline en chauffant la molécule à différentes températures. D'après la littérature, il existe des bactéries résistantes qui utilisent les antibiotiques comme source de nutriments. Pour vérifier cette hypothèse, on a essayé d'estimer la croissance de deux souches bactériennes en présence des résidus extrais des échantillons de poulets obtenus lors de l'analyse par turbidimétrie.

# RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

# I. La filière avicole

Depuis les années 1950, la production de viande de volaille s'est développée plus rapidement que celle de toute autre viande à l'échelle mondiale (Karcher et *al.* 2018). Cette augmentation a pour raison l'efficacité de conversion alimentaire et les coûts de production minimes associés à l'élevage intensif (Karcher et *al.* 2018). Une telle efficacité de production est particulièrement bénéfique pour les pays en développement, qui ont tendance à avoir des ressources agricoles limitées mais des populations en plein essor et souvent pauvres.

La croissance significative de la production (en particulier de poulets de chair) a contribué à la baisse des prix de l'alimentation animale et à l'augmentation de la consommation de volaille par habitant dans les pays en cours de développement, aussi à des implications importantes sur le commerce mondial de tout autre produit carné (Taha et *al.* 2003).

# 1. Secteur avicole en Algérie

## 1.1. Historique

Durant la période coloniale, la filière avicole venait d'apparaitre limitant sur l'élevage fermier des femmes paysannes (Ali ferrah 1988). Pendant la guerre de libération, le développement rapide de l'appareil militaro administratif a donné un coup de pouce à l'élevage avicole, âpres l'indépendance l'avènement du modèle agro-exportateur l'a freiné alors qu'elle venait juste de voir le jour (Ali ferrah 1988). En 1968, les anciennes porcheries ont été transformés en poulaillers d'engraissement, dans le but d'augmenter la ration alimentaire en protéine animale, l'office national des aliments du bétail (ONAB) a été créé en 1969 permettant d'organiser le secteur de production notamment le développent de l'élevage avicole par l'installation d'importantes unités :

- En amont de la production par le secteur privé apportant la matière première afin de fabriquer les aliments de production (intrants, fabricants d'aliments et de complexe minéral vitaminé).
- Le secteur en aval qui prend en charge la collecte, l'abattage, la transformation, la commercialisation et le stockage (Alloui *et al*. 2013).

C'est grâce à l'ONAB que des formations de techniciens ont été réalisées à l'étrangers assurant l'adaptation des connaissances techniques d'élevage, cependant le manque de matériels ainsi le nombre du cadre spécialisé ont limité le rôle de cet office.

Jusqu'aux années 89, la structure publique a géré les facteurs de production (reproducteurs, animaux …) tandis que le secteur privé avait le rôle de produire les produits finis (œufs de consommation, les poulets) (Alloui *et al.* 2013).

De 1990 à nos jours, la suppression du monopole de l'état a arrêté les investissements dans la filière du secteur public, en revanche le secteur privé a réalisé de grands progrès (Alloui et al. 2013).

L'aviculture nationale a connu une croissance notable au cours des quatre dernières décennies. Le taux de production est passé de 60000 à près de 290000 tonnes entre 1980 et 2019, soit une augmentation de près de 500% en 40 ans (FAO 2021), cela a amélioré l'apport moyen en protéines animales pour près de 35 millions d'Algériens (Alloui et al. 2013). L'Algérie a également enregistré une augmentation remarquable dans la consommation de la volaille allant de 2 kg/habitant/an en 1970 à 7,5 kg/ habitant/an en 2013 (FAO 2021).

### 1.2. Production des volailles

Le secteur de la volaille a pris un rang élevé dans l'économie algérienne depuis les années 1970 grâce à l'exploit d'une politique avicole visant à réduire le grave déficit en protéines dans l'alimentation nationale. Cette politique se traduit par la création d'offices nationaux organisant l'industrie avicole (ONAB, ORAC, ORAVIO, ORAVIE), et par la promotion du secteur privé dans le modèle de l'aviculture intensive (Alloui et *al.* 2013).

## II. La viande

### 1. Définition

La viande est la chair ou autres parties comestibles d'animaux (généralement des bovins, des volailles et des moutons domestiqués) utilisés pour l'alimentation (Lawrie et Ledward. 2006). D'après Mohtadji et Lamballais (1989), la classification de la viande est diverse et peut être basée sur :

- **Le groupe zoologique**
  - Viande de boucherie (bouf, mouton (agneau), cheval, veau).
  - Oiseaux de bassecour ou volailles.
  - Animaux sauvages ou gibiers.
- **Les parties consommables de l'animale**
  - Chair musculaire (muscle striés, long, plats)
  - Abats (muscles lisses)
  - Issus (partie de l'animal riches en tissu conjonctif), museau, oreilles.
  - Produits de charcuterie.
- **La couleur**
  - Viande rouge : animaux adultes qu'ont été saignés après l'abattage.
  - Viande blanche : animaux jeunes et volailles.
  - Viande noire : gibier qui n'a pas été saigné. Cette viande doit être faisandée pour l'attendrir et développer son fumer.

## 2. La volaille

### 2.1. Définition

Les volailles sont des oiseaux que l'on nourrit dans un élevage pour leur viande et leurs œufs. Elles regroupent des gallinacées (poulet, dinde, coq, pintade, caille) et des palmipèdes (canard, oie,..*etc*.) (Grashorn 2013).

### 2.2. Importance

De nombreux pays intègrent l'élevage avicole dans le cadre de plans de développement pour des raisons nutritionnelles, économiques ainsi que pour le gout. Les substances azotées notamment d'origine animale sont l'un des nutriments les plus importants à la vie et qui peuvent être fournies par les viandes y compris la volaille (Ndiaye 2002).

**2.2.1 Importance économique :** La volaille est devenue la viande la plus consommée au monde car c'est la viande la moins chère et la plus accessible. De plus, les prix de la viande bovine et porcine devraient continuer à dépasser ceux de la volaille à l'avenir (FAO 2015).

**2.2.2 Importance nutritionnelle :** Il est important de mentionner que le poulet avec peau contient 2 à 3 fois plus de matières grasses que le poulet sans peau, il doit donc être consommé sans peau pour garantir un apport en protéines de haute qualité sans calories ni matières grasses supplémentaires. Les personnes souhaitant réduire leur apport en matières grasses, ainsi qu'aux personnes souffrant de maladies cardiaques et coronariennes leurs recommande de consommer la viande de poulet blanche en raison qu'elle contient moins de calories et moins de gras saturés (Barroetta 2007). La viande de poulet est facile à digérer en raison de la faible quantité en collagène qu'elle contient, car ce dernier est une protéine structurelle réduisant la digestion de la viande (Marangoni et *al.* 2015).

### 2.3. Composition

Il existe une similarité dans le contenu de la viande rouge et blanche en composés azotés (20–21%), mais certaines différences peuvent être observées en ce qui concerne la teneur en matières grasses et les quantités de cholestérol et de certaines vitamines et minéraux (Tab.I). Le poulet dépose peu de graisse dans les muscles, et se caractérise par une teneur plus faible en sodium et en cholestérol que les autres viandes telles que le porc, le bœuf et le poulet (USDA 2021).

**Tableau I.** Comparaison de la composition chimique des viandes de veau (viande rouge) et de poulet (viande blanche) (USDA 2021)

| | Unité | Veau | Poulet |
|---|---|---|---|
| **Eau** | g | 75.91 | 75.46 |
| **Protéines** | g | 20.20 | 21.39 |
| **Matière grasse** | g | 2.87 | 3.08 |
| **Vitamines** | | | |
| C (acide ascorbique) | | | |
| Thiamine | mg | 0.08 | 0.07 |
| Riboflavine | mg | 0.28 | 0.14 |
| Niacine | mg | 7.83 | 8.24 |
| Acide pantothénique | mg | 1.37 | 1.06 |
| B-6 | mg | 0.43 | 0.43 |
| B-9 (Acide folique) | µg | 13 | 7 |
| B-12 | µg | 1.40 | 0.37 |
| A | µg | 0 | 16 |
| D3 (choloeacalciferol) | µg | - | 0.1 |
| E (alpha-tocopherol) | mg | 0.26 | 0.21 |
| K (phylloquinone) | µg | - | 1.8 |
| **Minéraux** | | | |
| Calcium | mg | 15 | 12 |
| Fer | mg | 0.85 | 0.89 |
| Magnésium | mg | 25 | 25 |
| Phosphore | mg | 211 | 173 |
| Potassium | mg | 328 | 229 |
| Sodium | mg | 86 | 77 |
| Zinc | mg | 3.23 | 1.54 |
| Cuivre | mg | 0.113 | 0.053 |
| Manganèse | mg | 0.029 | 0.019 |
| Sélénium | µg | 8.6 | 15.7 |
| **Cholestérol** | mg | 83 | 70 |

Les différences majeures entre les deux types résident dans la composition en acides gras (Tab.II), la viande de ruminants (veau par exemple) a une proportion plus élevée en acide gras saturés (AGS) et une teneur plus faible en acides gras insaturés (AGI) que le poulet (USDA 2021), qui est par conséquent considéré comme un produit maigre et sain, et peut être incorporé dans comme ingrédient important dans un régime alimentaire bien équilibré.

**Tableau II.** Comparaison entre la teneur en AGS et AGI (% de totalité en matières grasses) de veau (viande rouge) et de poulet (viande blanche) (USDA 2021)

| Acides gras | Veau | Poulet |
|---|---|---|
| 10:0 | 0.00 | 0.00 |
| 12:0 | 0.00 | 0.41 |
| 14:0 | 1.92 | 0.82 |
| 16:0 | 23.56 | 21.72 |
| 18:0 | 14.42 | 9.02 |
| Autres AGS | 1.45 | 0.41 |
| **Total. AGS** | **41.35** | **32.38** |
| 16:1 | 4.33 | 4.92 |
| 18:1 | 39.42 | 31.15 |
| Autres AGMI | 0.48 | 0.82 |
| 18:2 | 10.10 | 22.54 |
| 18:3 | 0.48 | 0.82 |
| 20:4 | 3.85 | 3.28 |
| Autres AGPI | 0.00 | 4.10 |
| **Total. AGI** | **58.66** | **67.63** |

## III. Les antibiotiques

### 1. Définition et origine

Contrairement à l'idée commune, selon laquelle la découverte des antibiotiques est confinée strictement à « l'ère des antibiotiques moderne », des recherches ont révélé que l'utilisation des substances à effets antimicrobiens pour traiter des infections remonte au Xe siècle (Bassett *et al.* 1980).

L'origine du terme « antibiotique » peut être attribuée au mot *antibiose* utilisé pour la première fois comme un antonyme du mot *symbiose* par Paul Vuillemin dans sa publication de 1889 qui décrit l'antagonisme entre différents micro-organismes (par exemple, champignons contre bactéries ; bactéries contre protozoaires) (Vuillemin 1889). Plus tard, le mot *antibiotique* a été utilisé pour décrire des métabolites secondaires naturels produits par des bactéries et des champignons possédant des activités inhibitrices de croissance (bactériostatiques) ou destructrices (bactéricides) contre les bactéries ou les champignons (Bentley et Bennett 2003).

Aujourd'hui, le terme a une portée plus large, dans un sens pour inclure des nouvelles molécules artificielles, et une définition plus étroite dans un autre, avec les termes *antibactérien* et *antifongique*, pour désigner leurs actions spécifiques contre les bactéries et les champignons, mais pas contre les virus (Bentley et Bennett 2003).

## 2. Utilisation

Les antibiotiques sont utilisés pour traiter ou prévenir les infections bactériennes, et parfois les infections à protozoaires (cas de métronidazole) (Leekha et *al.* 2011).

Lorsqu'une infection est soupçonnée d'être responsable d'une maladie mais que le pathogène responsable n'a pas été identifié, un traitement empirique est adopté, qui implique l'administration d'un antibiotique à large spectre en fonction des signes et symptômes présentés, en attendant les résultats de laboratoire qui peut prendre plusieurs jours (Gallagher 2012).

Une fois le microorganisme incriminé est identifié, on procède à une thérapie définitive. Cela implique généralement l'utilisation d'un antibiotique à spectre étroit. Le choix de l'antibiotique administré sera également basé sur son coût. L'identification est d'une importance cruciale car elle peut réduire le coût et la toxicité de l'antibiothérapie et également réduire la possibilité d'émergence d'une résistance antimicrobienne (Leekha et *al.* 2011).

Les antibiotiques peuvent être administrés également à titre préventif et cela est généralement limité aux populations immunodéprimées (le cas de VIH pour prévenir la pneumonie) et celles qui prennent des médicaments immunosuppresseurs, aussi les patients cancéreux et ceux qui subissent une intervention chirurgicale (Gallagher 2012).

## 3. Spectres d'activité

Le spectre antimicrobien d'un antibiotique désigne la gamme de micro-organismes qu'il peut éliminer ou inhiber. Les antibiotiques peuvent être divisés en antibiotiques à large spectre, antibiotiques à spectre étendu et antibiotiques à spectre étroit (Warrell et *al.* 2012). En effet, les antibiotiques à large spectre tel que l'oxytetracycline, l'amoxicilline, la sulfadiazine peuvent tuer ou inhiber un large éventail de microorganismes, alors que les antibiotiques à spectre étendu (ceftriaxones, cefalotine, ofloxacine) peuvent tuer ou inhiber les bactéries à Gram positif et certaines bactéries à Gram négatif, et les antibiotiques à spectre étroit (la vancomycine, la polymyxine, la teicoplanine) ne peuvent tuer ou inhiber que des espèces limitées de bactéries.

Actuellement, aucun spectre d'antibiotiques ne peut couvrir complètement tous les types de micro-organismes car certaines espèces bactériennes résistent naturellement à certains antibiotiques. En revanche, d'autres bactéries ont acquis des mutations génétiques et développé une résistance empêchant l'antibiotique à tuer le pathogène. Parfois l'élimination de certaines infections bactériennes ne s'effectue que par l'association de deux ou plusieurs molécules d'antibiotiques comme l'exemple de la sulfaméthoxazole associée à la triméthoprime (Courvalin *et al*. 1989).

## 4. Mécanismes d'action

Les cibles des antibiotiques sont la membrane cellulaire, la paroi cellulaire, la synthèse des protéines, et la synthèse des acides nucléiques et des composés métaboliques de base (Figure 1) (Kırmusaoğlu et *al.* 2019).

**4.1. Action sur la membrane plasmique** : La polymyxine B, qui est un antibiotique bactéricide, a été utilisée comme un traitement des infections causées par les bactéries à Gram négatif telles que les *Pseudomonas*. La polymyxine B constituée de peptides agissant comme détergents grâce à leur groupes lipophiles et hydrophiles, affecte l'arrangement des phospholipides de la membrane plasmique (Tortora *et al*. 1982). La valinomycine, qui est un ionophore, perturbe le potentiel électrochimique de la membrane cellulaire qui contribue à la phosphorylation oxydative en formant des pores dans la membrane cellulaire (Brooks 2001). Quand l'intégrité structurelle de la membrane plasmique est touchée, et le flux des ions est bouleversé, éventuellement l'organisme fera face à des dommages cellulaires et une mort imminente. La daptomycine, l'amphotéricine B, la colistine, les imidazoles et les triazoles agissent également comme inhibiteurs de la membrane cellulaire (Tortora, Funke et Case 1982) (Brooks 2001).

**4.2. Action sur la paroi :** Les bêta-lactames inhibent la synthèse du peptidoglycane en inactivant des enzymes appelées *penicillin binding proteins* (*PBP*). On pense que l'activité létale des bêta-lactames provient principalement de la perte d'intégrité de la paroi accompagnée d'une lyse cellulaire (Erlanger et Goode 1967)

**4.3. Inhibition de la réplication et la transcription :** ces fonctions peuvent être inhibées par des antibiotiques agissant comme des concurrents de substrats usuels. Le sulfaméthoxazole bloque la synthèse des précurseurs d'ADN et d'ARN et des protéines dû à son analogie structurelle avec l'acide para-aminobenzoïque; un substrat qui intervient lors des étapes de base dans la production de purines, de pyrimidine et de nombreux acides aminés (Tortora, Funke et Case 1982). Les quinolones, tels que l'acide nalidixique et le ciprofloxacine, indiqués lors du traitement des infections causées par *Pseudomonas spp*., empêchent l'ouverture de double-brin et la formation de fourche de réplication en inhibant l'ADN gyrase, en se liant à la sous-unité *gyrA*. La novobiocine et la coumermycine agissent de la même manière quand ils sont attachés à la sous-unité gyrB (Snyder et Champness 1997).

**4.5. Inhibition de la traduction** : Il existe une variété de molécules à spectre large agissant sur la synthèse protéique de différentes manières. On cite comme exemples (Snyder et Champness 1997):

- La puromycine imite l'extrémité 3' de l'$ARN_t$, induisant un arrêt précoce de la traduction de l'ARNm par le ribosome ;
- Le chloramphénicol inhibe la transcription en empêchant la liaison de l'aminoacyl $ARN_t$ au site A du ribosomes ;
- Les aminosides tels que la kanamycine, la néomycine, la gentamycine, la streptomycine, l'amikacine et la tobramycine, provoquent des fausses lectures de l'ARNm et des erreurs de traduction lors de l'enjambement, cela entraîne une perturbation de la multiplication cellulaire.

.

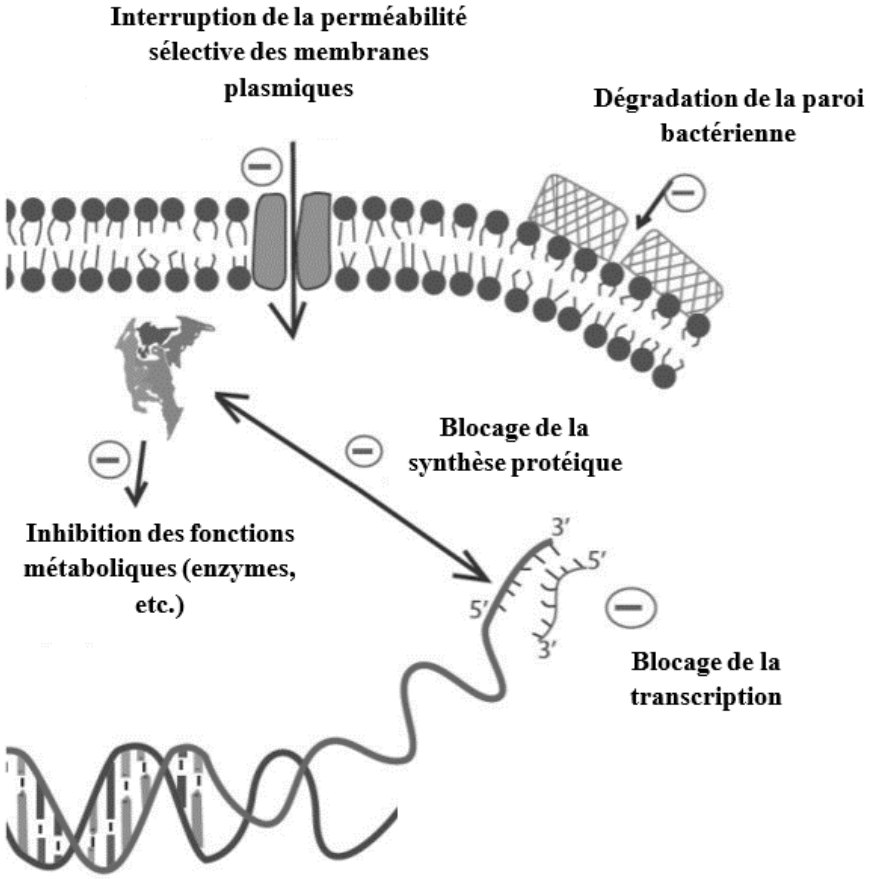
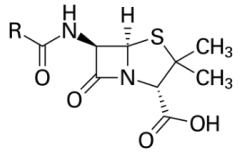
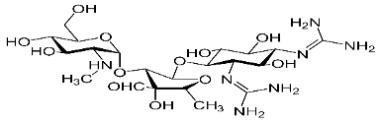
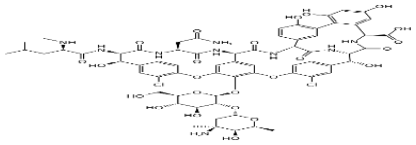
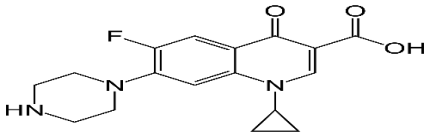
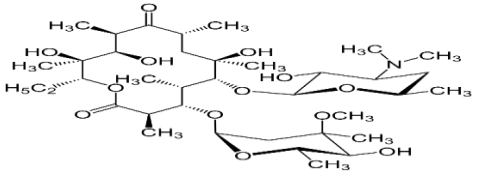
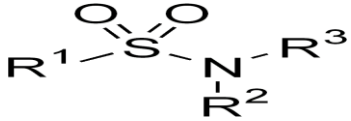
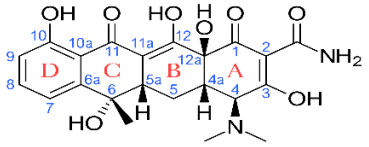



**Figure 1.** Différentes cibles des antibiotiques (Kırmusaoğlu *et al.* 2019)

## 5. Familles d'antibiotiques

Selon la nature chimique, les nombreux antibiotiques peuvent être classés en familles. Une famille d'antibiotique comprend des composés ayant des similitudes de structure et des mécanismes d'action comparables (Tab.III) (Compoundchem 2014**).**

**Tableau III.** Les familles d'antibiotiques (Compoundchem 2014)

| Famille | Exemples de molécules | Spectre/Germes sensibles | Mode d'action | Structure | |
|---|---|---|---|---|---|
| **β-lactamines** | Amoxicilline, Pénicilline G, Céfalexine | Spectre large | Inhibent la synthèse de la paroi |  | Contenant un noyau β-lactame. |
| **Aminosides** | Néomycine, Streptomycine | Spectre étroit (entérobactéries, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis)* | Inhibent la traduction de l'ARNm |  | Contenant des osamine |
| **Glycopeptides** | Vancomycine, Teicoplanine | Spectre étroit (la majorité des entérocoques) | Action sur la synthèse du paroi |  | Un glucide lié à une chaine peptidique |
| **Quinolones** | Ciprofloxacine, Levofloxacine, Moxifloxacine | Spectre large | Inhibent la multiplication cellulaire |  | Deux noyaux azotés liés à une cétone |
| **Macrolides** | Azithromycine, Clarithromycine, Erythromycine | Spectre large | Inhibent la synthèse protéique |  | Contenant un noyau macrolide |
| **Sulfamides** | sulfaméthoxazole, triméthoprime | Spectre large | Interruption des voies métaboliques |  | Un groupement sulfonyle attaché un à un |
| **Tétracyclines** | Oxytétracycline, Chlorotétracycline | Spectre large | Inhibent la synthèse protéique |  | Constitué de quatre noyau désignés A, B, C, D |

## 6. Usage des antibiotiques en élevage aviaire

Depuis leur apparition dans les années 1930, les antibiotiques ont non seulement eu un impact sur la médecine humaine, mais aussi sur la production alimentaire. Dans les fermes, les flottes de pêche ainsi que dans les usines de transformation et les aquacultures, les antibiotiques étaient utilisés pour traiter et prévenir les maladies, augmenter la conversion de nourriture animale et conserver les produits alimentaires (Lesch 2007).

Leur diffusion rapide dans presque toutes les filières du domaine alimentaire a été initialement considérée comme un progrès tant sur le plan économique que scientifique. Néanmoins, à partir des années 1950, l'utilisation d'antibiotiques en agriculture a déclenché des conflits au sujet de présence des résidus d'antibiotique dans l'alimentation humaine (Smith-Howard 2010).

La volaille est la filière la plus affectée par les maladies infectieuses. Les animaux vivant dans des environnements insalubres (souvent dans des installations surpeuplées et mal ventilées) sont plus exposés aux pathogènes, et nécessitent des actions rapides, parfois insouciantes de la santé humaine (le non-respect des quantités prescrites par exemple) dans le but de sauver le cheptel (Tomley et *al.* 2009). Il convient de mentionner également les dépassements commis intentionnellement -à petite échelle- par quelques éleveurs pour améliorer les rendements, parmi lesquels on cite l'usage des antibiotiques comme promoteurs de croissance (Martin *et al.* 2015).

## 7. Les risques sanitaires potentiels liés aux résidus des antibiotiques

Comme tout autre type de médicament et peu de temps après leur administration dans le corps, les antibiotiques se distribuent dans le corps et parviennent au site d'atteinte à travers la circulation sanguine. Après éradication de la source d'infection, les molécules d'antibiotiques subissent une série de réactions de dégradation qui s'achèvent par une élimination et excrétion de leurs métabolites en dehors de l'organisme (Fig.2) (Yılmaz *et al*. 2017).

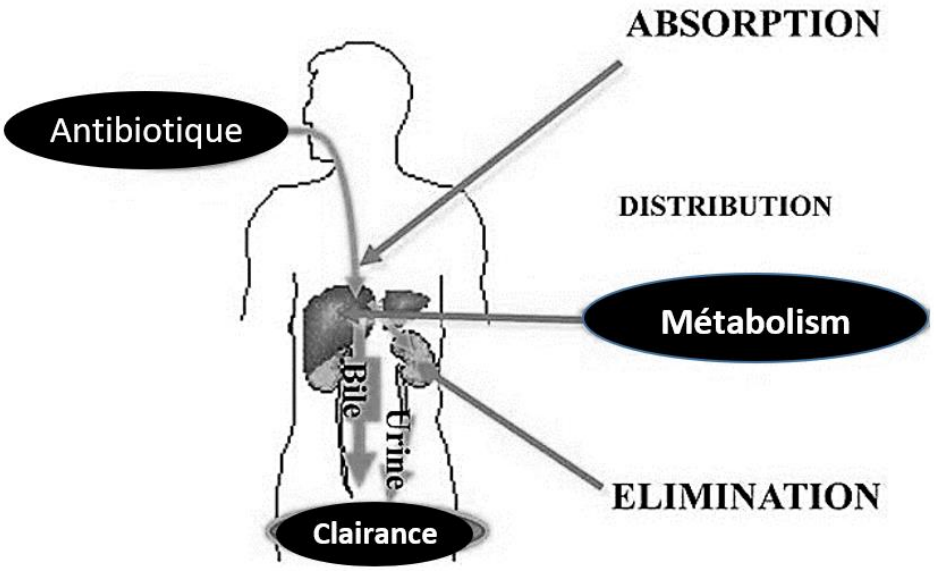



**Figure 2.** Etapes clés du devenir d'un médicament dans l'organisme (Yılmaz et Özcengiz 2017).

Ce processus biologique pourrait être interrompu si les animaux sujets d'une antibiothérapie subissent un abatage sans tenir compte le délai d'attente (DA) relatif à la molécule administrée, cela représente la période qui s'étale du moment à partir duquel l'animal a été dernier traité avec le médicament, au moment de l'abattage (Règlement (UE) 2019/6 n.d.). Le délai d'attente permet aux médicaments (ou aux résidus de médicaments) dans les tissus comestibles de l'animal traité d'atteindre des niveaux inférieurs ou égaux à la limite maximale des résidus (LMR). Les LMR sont fixés basant sur des essais permettant d'évaluer avec certitude des concentrations de résidus considérées comme ne présentant pas de risques toxicologiques pour le consommateur, aussi les possibilités de leur élimination par l'organisme humain facilement (Tab. IV). Les LMR sont réglementées et ne doivent en aucun cas être dépassées, il est illégal pour les éleveurs de vendre un animal destiné à la consommation humaine dont les résidus de médicaments dans ses tissus comestibles sont au-delà des LMR (Règlement (CE) N° 470 2009).

**Tableau IV :** Limites maximales des résidus **(**LMR) et délais d'attente (DA) de quelques antibiotiques utilisés en filière aviaire (FAO/OMS 2018)

| Antibiotique | LMR (µg/Kg) | DA |
|---|---|---|
| Amoxicilline | 50 | 1 à 2 jours |
| Chlortetracycline/Oxytetracycline | 200 | 2 semaines |
| Tylosine | 100 | 8 à 10 jours |
| Avilamycine | 200 | 0 jours |
| Pénicilline G | 50 | 0 jours |
| Colistine | 150 | 7 jours |
| Doxycycline | 200 | 5 jours |

La consommation de produits alimentaires contenant des résidus présente des risques sanitaires majeurs. Les divers effets néfastes des résidus antimicrobiens sur la santé humaine peuvent être ;

### 7.1. Antibiorésistance

Les bactéries développent une forme de résistance pour tenter de survivre à l'antibiothérapie. Les cellules bactériennes peuvent acquérir une résistance aux antibiotiques par des mutations qui se produisent dans l'ADN lors de la réplication, ou par un transfert latéral de gènes. En tant que bactéries provenant des animaux, et dû aux analogies physiologiques, elles peuvent franchir la barrière d'espèces, s'intégrer à la flore endogène humaine, et apporter des nouveaux gènes de résistance chez l'homme. Les fluoroquinolones sont un exemple de médicaments qui provoquent l'émergence de bactéries résistantes dans les aliments d'origine animale (Landers, et *al*. 2012). La résistance des micro-organismes, résultant des utilisations sous-thérapeutiques de la pénicilline, des tétracyclines et des sulfamides dans l'agriculture est suggérée par l'OMS comme une question hautement prioritaire (NRC 1991).

### 7.2. Réactions d'hypersensibilité

Environ 50% de la population humaine est considérée comme hypersensible à un certain nombre de substances médicamenteuses. Les réactions allergiques aux antibiotiques comprennent l'anaphylaxie, la maladie sérique, des réactions cutanées et des réactions d'hypersensibilité retardées chez les individus sensibles. Ces effets sont acquis après que les êtres humains ont consommé des aliments d'origine animale contenant des résidus de

médicaments ayant des effets allergiques. La pénicilline et la streptomycine semblent, d'après l'utilisation clinique chez l'homme, être plus incluses pour produire une hypersensibilité ou une allergie que d'autres molécules (Papich 2009).

### 7.3. Effets cancérigènes

Parmi les médicaments vétérinaires cancérigènes on trouve les nitrofuranes, les nitromidazoles et la quinoxaline. Ces médicaments sont transmis aux humains par le biais d'aliments d'origine animale sous forme de résidus d'antibiotiques. Les dangers potentiels des résidus cancérigènes sont liés à leur interaction avec divers composés intracellulaires tels que les acides nucléiques et ribonucléiques, cela conduit à des changements dans le matériel génétique, créant des cellules cancéreuses et des tumeurs par conséquence (Aiello 2016).

### 7.4. Effets tératogènes

Le terme *tératogène* s'applique à un médicament ou à un agent chimique qui produit un effet toxique sur l'embryon ou le fœtus pendant les phases critiques de la gestation. Pour cet effet, une malformation congénitale qui affecte l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'organisme est produite. La tétracycline peut traverser la membrane placentaire et se déposer les os et les dents. L'exposition à la tétracycline peut entraîner une coloration jaune des dents primaires et une croissance lente des os longs (Aiello 2016).

### 7.5. Perturbation de la flore intestinale normale

Les bactéries qui vivent habituellement dans l'intestin agissent comme une barrière pour empêcher l'établissement d'un pathogène entrant et provoquer des maladies. Les antibiotiques peuvent réduire le nombre total de bactéries ou tuer sélectivement certaines espèces importantes. Les antibiotiques à large spectre peuvent avoir des effets néfastes sur une large gamme de la flore intestinale et par conséquent provoquer des troubles gastro-intestinaux. Par exemple, l'utilisation de médicaments comme la flunixine, la streptomycine et la tylosine chez les animaux, ainsi que l'utilisation de la vancomycine, du nitroimidazole et du métronidazole chez l'homme sont connues pour cet effet (Cotter et *al*. 2012)

## IV. Méthodes de dépistage et de quantification des résidus d'antibiotiques

L'un des principaux objectifs des cadres réglementaires nationaux et internationaux pour l'utilisation des médicaments vétérinaires, y compris les antibiotiques, chez les animaux destinés à la consommation humaine est de garantir que les produits autorisés sont fabriqués conformément aux normes.

Des méthodes analytiques sont nécessaires pour détecter, quantifier et confirmer rapidement et précisément les résidus d'antibiotiques dans les aliments afin de vérifier que les normes réglementaires ont été respectées, et pour retirer du marché tout aliment non-conforme.

### 1.Tests d'inhibition microbienne

Les tests d'inhibition microbienne (TIM) sont des techniques de dépistage offrant l'avantage de détecter l'activité biologique totale associée à des résidus inconnus (analyse non-ciblée). Ce sont des méthodes de choix lorsqu'une estimation de l'activité antimicrobienne est requise. (Stead 2000).

Les TIM sont sensibles aux composés qui inhibent ou perturbent la croissance d'un micro-organisme d'essai. A cet effet, les tests d'inhibition microbienne sont largement utilisés pour la détermination de la présence ou l'absence de résidus antimicrobiens dans le lait, tissus animaux et produits alimentaires (Stead 2000).

La diffusion sur agar, basée sur la détermination des zones d'inhibition d'un organisme d'essai ensemencé sur un milieu gélosé, est peut-être la technique de dépistage la plus largement utilisée. Pendant la période d'incubation, l'échantillon liquide diffuse d'un support dans le milieu gélosé. Après une incubation de plusieurs heures (entre 8 et 36 h selon le test particulier), la taille des zones d'inhibition peut être mesurée. Si des composés antimicrobiens sont présents au-dessus d'une certaine concentration, le micro-organisme sera inhibé (en raison de la mort microbienne et / ou arrêt de la croissance), et des halos clairs sont visibles sur la gélose (Diekema 2003).

### 2. Kits de tests rapides

Différents types de tests rapides sont actuellement disponibles pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, et ils peuvent être largement classés en tant qu'essais immunolo-enzymatiques. Les tests rapides fournissent généralement des résultats qualitatifs ou semi-quantitatifs et sont souvent des tests portables applicables pour un fonctionnement *in situ*. Dans une ligne de production, le terme « *rapide* » peut signifier l'obtention de résultats analytiques dans un délai

suffisant pour éliminer les matériaux non conformes avant le traitement. Idéalement, les résultats des tests doivent être disponibles dans un délai de 30 minutes et les exigences ou la préparation des échantillons doivent être minimales (Bergwerff et *al.* 2005).

Le kit immuno-enzymatique (ELISA) est un test rapide de biochimie analytique couramment utilisé, décrit pour la première fois par Engvall et Perlmann en 1971. La technique repose sur un essai immuno-enzymatique en phase solide pour détecter la présence d'un ligand (la molécule recherchée) dans un échantillon liquide à l'aide des anticorps dirigés contre la molécule en question. ELISA a été utilisé comme outil de diagnostic en médecine, phytopathologie et biotechnologie, et contrôle de qualité dans diverses industries (Engvall 1971).

**3. Turbidimétrie**

Les dosages turbidimétriques ont été utilisés pour l'évaluation des antibiotiques depuis le début de l'utilisation de la pénicilline. La compréhension du dosage turbidimétrique pour la recherche des antibiotiques repose sur deux concepts : (a) l'interaction entre l'antibiotique et le micro-organisme d'essai ; et (b) la signification de la turbidité. Il est nécessaire pour un dosage turbidimétrique adéquat que l'antibiotique interagisse avec le microorganisme testé afin de modifier sa cinétique de croissance (concentration d'antibiotique liée à une turbidité) (Kavanagh 1968).

La turbidité dans une suspension est traduite en première approximation par le développement d'une surface des particules actives, par la suite elle est traduite par la mesure des modifications des spectres d'absorption lumineuse par un moyen optique des particules dans l'état adsorbé ou on va déterminer le degré d'adsorption selon une quantité connue de l'échantillon (Lan Tran Ngoc et Devigne 1984).

On utilise un spectrophotomètre d'adsorption UV-visible pour préciser les longueurs d'ondes, la lecture est effectuée sur des tubes contenant la souche sensible avec de l'antibiotique dans le milieu de culture, ou les longueurs d'ondes varient selon la charge présente. (Martin 2002).

## 4. Méthodes quantitatives confirmatoires

Contrairement aux méthodes rapides de détection, les techniques de confirmation sont suffisamment sensibles, ont un coût et un débit raisonnables et ne doivent donner aucun résultat faux positif. De préférence, les méthodes de confirmation devraient impliquer la détermination par des méthodes de séparation moléculaire afin qu'une identification sans ambiguïté de l'analyte soit possible. Jusqu'à récemment, les méthodes de confirmation reposaient sur un couplage de différentes techniques pour donner une garantie supplémentaire aux résultats.

La spectrophotométrie repose sur l'absorption des fuseaux de lumière à une longueur d'onde précise par les composés présents dans l'échantillon. Elle est principalement utilisée pour la quantification de résidus, tandis que les dernières recherches ont développé des méthodes valides, simples et moins coûteuses pour analyses d'antibiotiques sur HPLC (chromatographie liquide à haute performance) et LC-MS (chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem). La chromatographie liquide s'est révélée sensible, reproductible, fiable et très utile pour l'analyse des résidus d'antibiotiques, et à l'aide des méthodes chromatographiques, nous pouvons être en mesure de quantifier la présence d'une très faible quantité de médicament dans un échantillon (Wang et *al.* 2012)

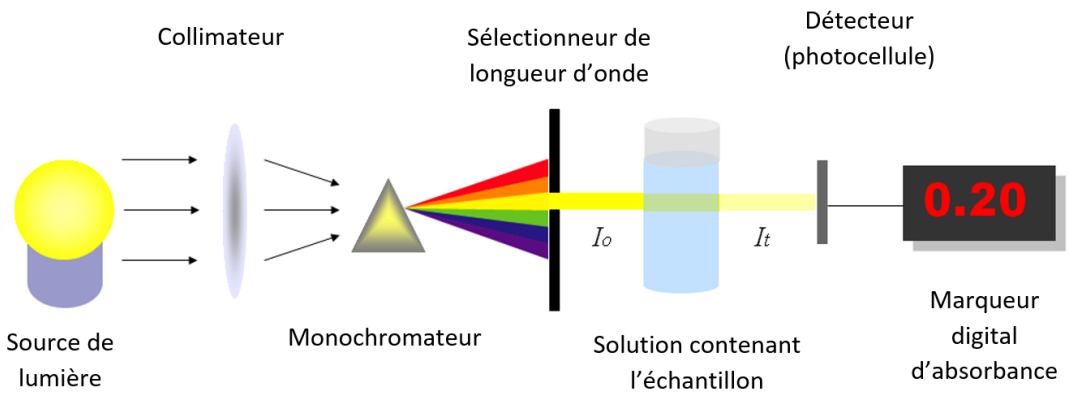



**Figure 3:** représentation schématique de la technique spectrophotométrique (Wang, MacNeil et Kay 2012)

La séparation chromatographique (HPLC ou LC-MS) vise à séparer les substances actives dans les solvants de migration, qui sont des mélanges d'analytes qui transportent selon deux phases différentes, une phase mobile qui assure le transport de l'analyte, et une autre phase immobile ou dite stationnaire, qui au niveau moléculaire permet le transport uniforme et l'interaction avec des phases mobiles et d'autres stationnaires (Meyer 2010).

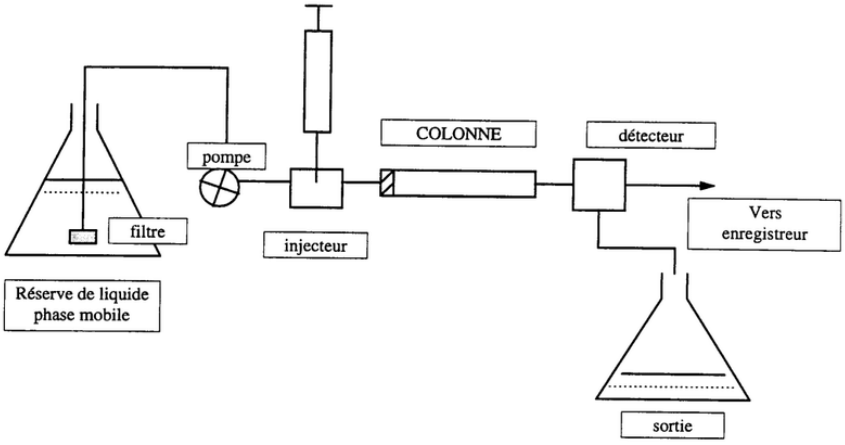



**Figure 4 :** représentation schématique du principe chromatographique (Meyer 2010)

**4.1 La spectrométrie de masse :** Après injection des échantillons par HPLC, les composants du mélange doivent être détectés pour être analysés. Le couplage GC (Chromatographie en phase gazeuse) avec MS a été inventé dans les années 1950 tandis que le couplage LC-MS a rencontré des limitations dû à une incompatibilité entre les sources d'ionisation du MS déjà existante et le flot en phase liquide. Il a fallu attendre les années 1980 pour qu'un couplage LC-MS puisse être utilisé grâce au développement de nouveaux modes d'ionisation par Fenn et *al.* en 1989.

Les méthodes de dépistage par LC-MS multi résidus permet la surveillance et l'enregistrement continu de l'absorbance UV a une longueur d'onde sélectionnée ou sur une plage de longueurs d'onde. L'apparition de l'analyte dans la cellule du détecteur provoque le changement de l'absorbance, selon un système d'informatique qui contrôle tous les paramètres de l'instrument HPLC (composition de l'éluant) et acquiert les données du détecteur et surveille les performances du système, en cas ou l'analyte absorbe plus (phase mobile) on obtient donc un signal positif (surveillance continue de la composition de la phase mobile et de la température...) (Meyer 2010).

# MATÉRIELS

# &

# MÉTHODES

# I. Matériel

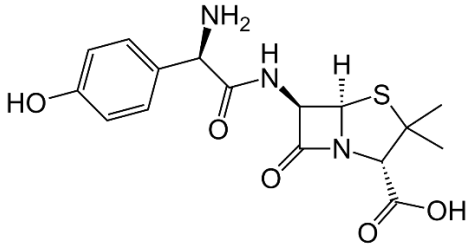
## 1. Matériel non biologique

Durant notre stage de fin d'étude, nous avons utilisé des appareils (Annexe 1), des solutions (Annexe 2) et des milieux de culture (Annexe 3).

L'ensemble des expériences ont été réalisées au niveau de laboratoire universitaire de la faculté des sciences, université de Médéa, et le laboratoire de contrôle de qualité de SAIDAL-Médéa.

**Le choix de la molécule d'antibiotique :** L'amoxicilline trihydraté est un antibiotique fréquemment administré en élevage aviaire pour la prévention et le traitement de plusieurs infections bactériennes, plus particulièrement les atteintes respiratoires (Ramos et *al.* 2012). Toutefois, l'utilisation de cette substance peut entraîner des résidus qui demeurent dans les tissus comestibles des animaux destinés à la consommation humaine, surtout dans le cas où les délais d'attente ne sont pas respectés. Les résidus d'antibiotiques représentent un danger pour la santé si leurs quantités dépassent les LMR réglementés. La LMR de l'amoxicilline trihydraté est de 50 µg/kg pour le muscle de poulet (Règlement UE 37/2010). Les caractéristiques chimiques de la molécule sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau V:** caractéristiques chimiques de l'amoxicilline (PubChemNCBI s.d.)

| | |
|---|---|
| **Structure** |  |
| **Formule** | $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ |
| **Masse molaire** | 365,4 g/mol |
| **Solubilité** | Eau, Tampon pH 5 |
| **Aspect** | Poudre cristalline blanche |

## 2. Matériel biologique

### 2.1. Poussins

Le modèle de choix pour notre étude est le poussin (Figure 5). Les poussins ont été choisis en fonction du sexe (femelle) et l'âge (25 jours) et fournis par un élevage situé à Tibhirine.



**Figure 5 :** poussins sujets d'éxperience

### 2.2. Souches bactériennes

*Bacillus subtilis* **(**ATCC6051)**,** et *E. coli* (ATCC 25922) sont fournies par le laboratoire de contrôle de qualité de SAIDAL, et *Paenabacillus phocaensis* fournie par le laboratoire de biologie de sol de USTHB.

# II. Méthodes

## 1. Mise en place du dispositif expérimental

Des poussins de poids de 490g à713g sont partagés en 2 lots et soumis à des régimes alimentaires différents pendant une semaine : le 1er lot témoin (n=4) : recevant un régime alimentaire composé de grains de maïs et d'eau. Le 2em lot (n=16) : recevant un régime alimentaire composé de grains de maïs et de l'eau dans laquelle on a rajouté de l'amoxicilline. Il convient de mentionner que les grains de maïs donnés à volonté et de l'amoxicilline 1g /L renouvelé après sa consommation. Avant abattage, les poussins ont été repesés.

## 2. Effet de l'amoxicilline sur la variation de poids

Afin d'examiner de point de vue statistique la différence de poids entre les sujets positifs traités et les sujets non traités après la période d'élevage, et pour vérifier si l'administration non-contrôlée d'un antibiotique peut améliorer le rendement en chair, nous avons effectué un test statistique paramétrique qui s'appelle le ***test-t de student*** qui est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si le poids moyen des deux groupes sont significativement différentes (Morgenthaler 2007)**.**

Il existe plusieurs variants du test-t de Student, on a choisi celui qui permettra de comparer le poids moyen des deux groupes d'échantillons indépendants (*test-t non-apparié*) (Morgenthaler 2007): un groupe de 4 poussins femelles désigné « Lot témoin» qui ont reçu que des grains de maïs et de l'eau, et un autre groupe de 16 poussins désigné « Lot traité », recevant en plus du maïs, de l'amoxicilline en forte doses dissoutes dans l'eau de boisson. Cette opération s'est poursuivie pendant 7 jours.

On se pose donc la question à savoir si le poids moyen du lot témoin est significativement différent de celui du lot traité dû à l'administration de l'amoxicilline et non pas au hasard ?

La valeur *t* de Student est donnée par la formule suivante (Morgenthaler 2007) :

$$t = \frac{Pm_{témoin} - Pm_{traité}}{\sqrt{\frac{S^2}{n_{témoin}} + \frac{S^2}{n_{traité}}}} \qquad (\text{eq. } 1)$$

$Pm_{témoin}$ et $Pm_{traité}$ : le poids moyen du lot témoin et celui du lot traité respectivement.

$n_{témoin}$ et $n_{traité}$: les tailles du lot témoin et celle lot traité respectivement.

$S^2$ est la variance commune aux deux groupes. Elle est calculée par la formule suivante:

$$S^2 = \frac{\sum(P_i - Pm_{traité})^2 - \sum(P_i - Pm_{témoin})^2}{d.d.l} \qquad (\text{eq. } 2)$$

$P_i$: poids individuel par poussin

*d.d.l* : degré de liberté

Pour savoir si la différence est significative, il d'abord lire dans la **table t** (annexe 4), la valeur critique correspondant au risque alpha bilatéral $p$<0.05 pour un degré de liberté :

$$d.d.l = n_{traité} + n_{témoin} - 2 \qquad (\text{eq. } 3)$$

Si la valeur absolue de t (|t|) est supérieure à la valeur critique, alors la différence entre les poids moyens des deux groupes est significative.

## 3. Echantillonnage

### 3.1. Abatage et découpage

De point de vue culinaire et nutritionnelle, il y a une grande demande pour le bréchet de poulet parce qu'il a un goût agréable et très faible en gras, de côté analytique, il vaut mieux séparer les résidus à partir d'une matrice contenant une faible quantité de matière grasse comme le bréchet, dû à la complexité des méthodes d'extraction couteuses qui concerne les matrices graisseuses comme les cuisses. L'abatage des sujets est fait sans respect du délai d'attente. Les conditions d'hygiène sont assurées lors de l'écorchage afin de minimiser tout risque de contamination. Les bréchets des sujets traités et non traités ont été découpés dans des conditions stériles, et mis dans des boites étiquetées et désinfectées avec de l'éthanol avant de procéder à la cuisson.

### 3.2. Cuisson

Les bréchets des 16 animaux traités sont hachés à l'aide d'un hachoir, devisés en 4 lots de 50 g, et 3 de ces lots sont mis à différents traitements thermiques, ils s'agissent d'une cuisson dans le four, la microonde et la cocotte. Les bréchets des sujets non-traités sont hachés également et une quantité de 50 g est prélevée mais elle ne sera pas cuite (Tableau VI), à la fin nous avons obtenus 5 échantillons à analyser :

AMO (-) : Témoins, sans ajout d'amoxicilline et n'ont pas été cuits.

AMO (+) : Témoins positif, avec ajout d'amoxicilline et n'ont pas été cuits.

AMO $(+)_{150}$ : Traités avec l'amoxicilline cuits au four à 150°C pendant 25 minutes.
AMO $(+)_{120}$ : Traités avec l'amoxicilline cuits au cocotte-minute à 120°C pendant 30 minutes.
AMO $(+)_{\mu\text{-ondes}}$ : Traités avec l'amoxicilline cuits au microondes à 1200 W pendant 10 minutes.

Les échantillons frais et cuits sont entreposés dans des boites stériles, congelés et transportés dans une glacière adéquate vers les lieux de stage.

**Tableau VI:** plan d'échantillonnage

| Echantillon | Quantité (g) | Type de cuisson | Température (°C) | Temps (min) | Puissance (W) |
|---|---|---|---|---|---|
| **AMO (-)** | | -- | -- | -- | -- |
| **AMO (+)** | | -- | -- | -- | -- |
| **AMO $(+)_{120}$** | 50 | Cocotte-minute | 120 | 30 | -- |
| **AMO $(+)_{150}$** | | Four | 150 | 25 | -- |
| **AMO $(+)_{\mu\text{-ondes}}$** | | Microondes | -- | 10 | 1200 |

### 4. Recherche des résidus de l'amoxicilline

La recherche des résidus de l'amoxicilline dans les échantillons de bréchets obtenus à partir de poulet frais et cuit par la méthode de turbidimétrie (Jørgensen 1985). Dans le test de turbidité, la multiplication d'un microorganisme causera une augmentation de la turbidité du milieu. En présence des antibiotiques, une diminution de turbidité reflète l'effet de la substance antimicrobienne sur la population des bactéries inoculées dans le milieu. La turbidité résultante est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm (Jørgensen 1985).

#### 4.1. La préparation du Tampon pH 5

Le tampon pH 5 est le réactif optimal qui assure une dissolution totale de l'amoxicilline. Une pesée de 6.8 g de $KH_2PO_4$ est dissoute dans 1L d'eau distillée stérile. Le pH de la solution est ajusté à 5.0 par l'addition de KOH 45%.

#### 4.2. Préparation de la solution d'étalon (0.1 mg/ml)

La solution d'étalon contient une concentration connue d'amoxicilline et permette une estimation approximative de la teneur en antibiotique des échantillons, elle est

constituée d'une quantité de 10 mg d'amoxicilline dissoute dans 100 ml d'eau distillée stérile.

### 4.3. Activation de la souche *Bacillus subtilis*

Des colonies prélevées de *Bacillus subtilis* (ATCC6051) ont été étalées à l'aide d'une lance de platine sur les parois d'un flacon en verre stérile contenant 100 ml de bouillon tryptone-soja. Le milieu a été ensuite incubé pendant 24 heures à 37 °C.

### 4.4. Extraction de jus de viande

Après décongélation des échantillons, 1 g de chaque échantillon est mis dans un tube préalablement stérilisé contenant 10 ml d'éther 99%, le mélange est ensuite agité à l'aide d'un vortex pendant 1 minute. Le contenu de chaque tube a été renversé dans une ampoule à décanter, 20 ml du tampon pH 5 est ajouté au mélange, l'ampoule est secouée manuellement jusqu'à séparation de deux phases, une phase supérieure huileuse et une phase inférieure aqueuse. La phase aqueuse est considérée comme le jus de la viande est récupérée dans une fiole stérile et complétée au 25 ml avec le tampon pH 5. Les solutions résultantes de l'étape d'extraction sont conservées à 4°C.

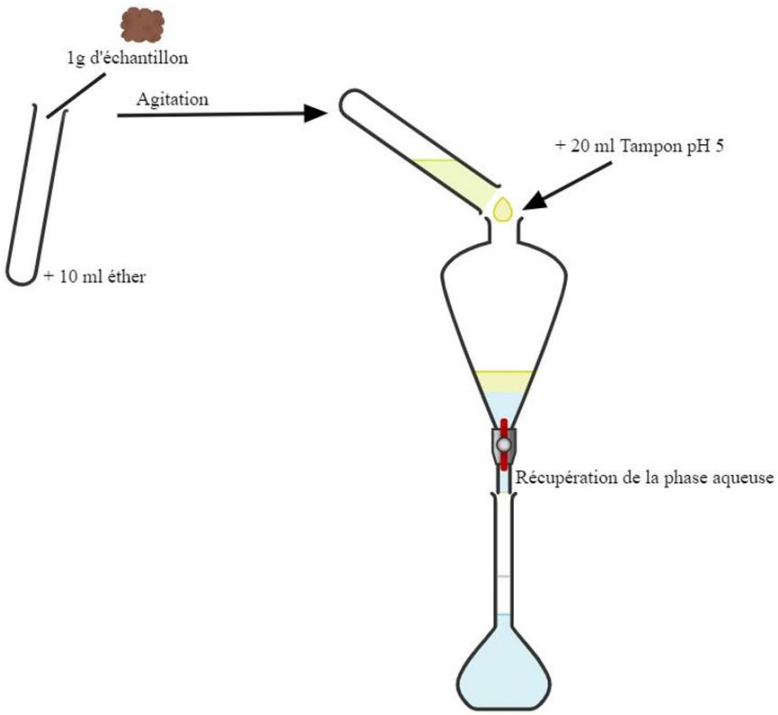



**Figure 6** : différentes étapes de l'extraction de jus de viande

### 4.5. Incubation

Avec une pipette graduée stérile, 1 ml de chaque échantillon [AMO (-), AMO (+), AMO (+) $_{120,}$ AMO (+)$_{150}$, AMO(+)$_{\mu\text{-ondes}}$] est prélevé et renversé dans des tubes à essai contenant 9 ml du milieu TSB ensemencé avec la souche ; (Remarque : un tube reste sans ajout d'extrait de viande et sert comme témoin). Les tubes sont ensuite vortexés vigoureusement, et mis dans un bain marie à 37°C pour une incubation de 5 heures.

### 4.6. Lecture

Une quantité de chaque tube (y compris les tubes témoin et étalon) est renversée dans des cellules en quartz pour qu'elle soit lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm (H.L.Jørgensen, 1985).

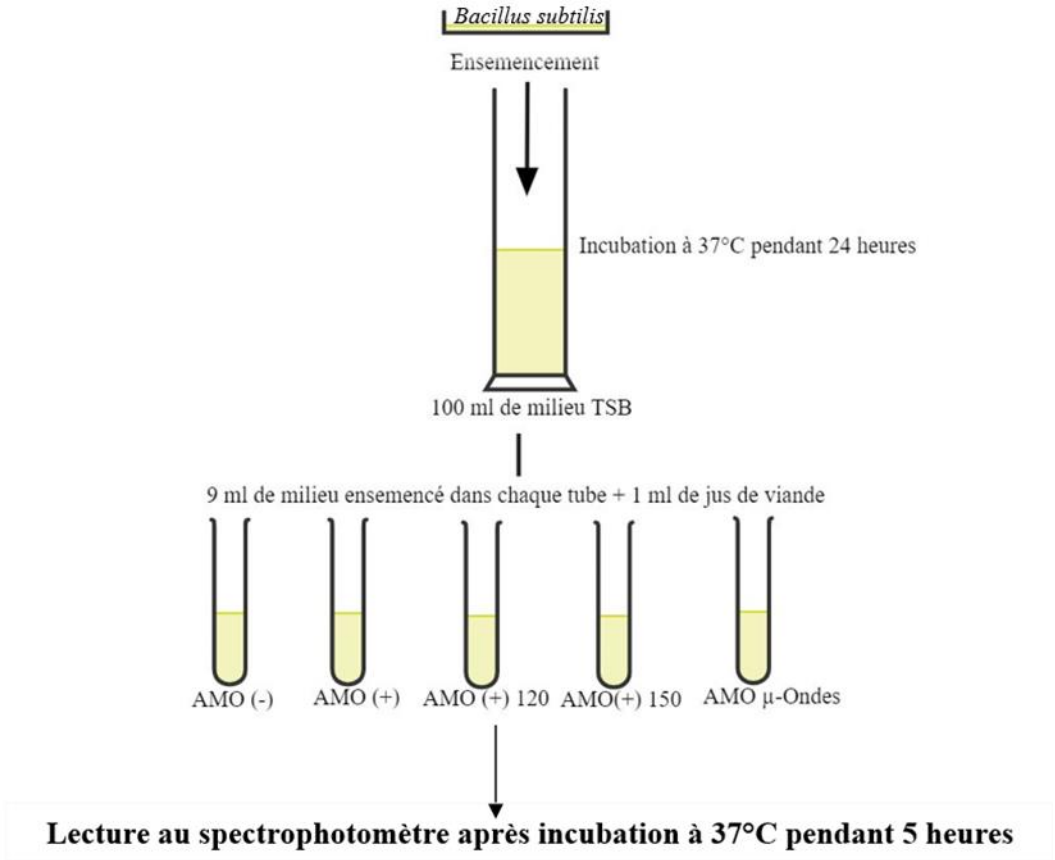
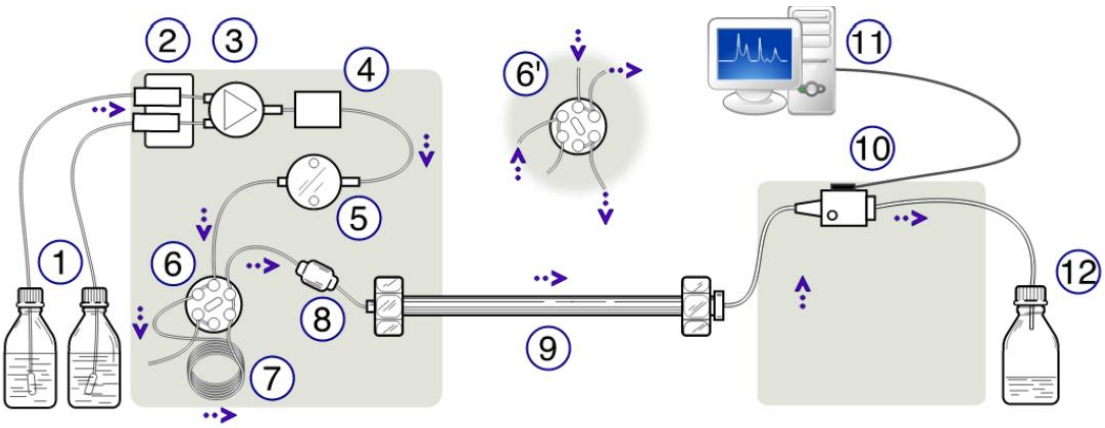



**Figure 7 :** étapes préparatives (ensemencement et incubation) des échantillons avant la lecture

## 5. Identification et quantification des résidus d'amoxicilline

La quantification des résidus d'amoxicilline dans les échantillons frais et cuits est effectuée par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). L'HPLC est un moyen efficace pour séparer les différents constituants d'un mélange afin de les quantifier. Cette technique repose sur le passage d'un échantillon dissous dans un solvant à travers d'une colonne contenant un gel poreux qui a la propriété de retenir les molécules selon leur polarité ou affinité. La molécule recherchée est retenue pour plus ou moins longtemps dans la colonne avant d'en sortir vers un détecteur UV pour que sa concentration sera enregistrée sous forme d'un pic établi par le logiciel associé à l'appareil HPLC. La concentration des composants d'un mélange sera mesurée après achèvement d'analyse avec les aires des pics présents sur des chromatogrammes affichés sur un écran (Meyer, 2010).




**(1) solvants « phase mobile » (2) dégazeur (3) soupape de gradient (4) récipient mélangeur de la phase mobile (5) pompe haute pression (6) soupape d'inversion en position d'injection (6') soupape d'inversion en position de chargement (7) boucle d'injection de l'échantillon (8) pré-colonne (9) colonne d'analyse « phase stationnaire » (10) détecteur (11) acquisition de données (12) collecte de déchets.**

**Figure 8 :** Schéma représentatif de system HPLC (Meyer 2010)

**5.1. Préparation de l'étalon (solution standard) :** une solution dite « standard » à concentration connue donnera l'aire de pic standard nécessaire pour le calcul des concentrations des résidus dans les échantillons à concentration inconnue.

Une pesée de 50 mg d'amoxicilline $3H_2O$ standard est dissoute dans 100 ml de tampon pH 5. 1 ml de la solution est prélevé et complété au 10 ml avec le même solvant.

**5.2. Extraction de résidus:** 1g de chaque échantillon est mis dans un tube à essai étiqueté, auquel 10 ml de tampon pH5 est ajouté, le mélange est homogénéisé par la suite avec un VORTEX. Apres centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 minutes, 5 ml de surnageant est prélevé et complété à 25 ml avec le tampon pH 5 dans des fioles étiquetées. La filtration a été réalisé à l'aide d'un filtre-seringue 0.45µm avant d'injecter les échantillons dans l'HPLC (USP 2017)**.**

**5.3. La phase mobile :** Une solution qui véhicule les échantillons dans le système HPLC. Elle est constituée de tampon pH 5 préparé dans l'étape de recherche des résidus, et du méthanol. En HPLC, il est recommandé d'exécuter un gradient de détection si les conditions d'une séparation réussie sont inconnues. Un tel essai est effectué de 10 à 90 % du solvant organique (méthanol) pendant 26 minutes. Pour effectuer notre analyse, nous avons utilisé le gradient monographié en USP 41:

**Tableau VII:** gradient de la phase mobile (Tampon pH5 :Méthanol) (USP, 2017)

| Temps (min) | Tampon pH 5 (circuit A) | Méthanol (circuit B) |
|---|---|---|
| **0** | 97 | 3 |
| **10** | 97 | 3 |
| **22** | 75 | 25 |
| **26** | 97 | 3 |

**5.4. Conditions chromatographiques** : les conditions opératoires impliquent une longueur d'onde de 210 nm, un débit de 1ml/min, un volume d'injection de 10 µl, et une colonne analytique Phenomenex ®$C_{18}$ (25 cm x 4mm) 5µm.

**6. Etude de la cinétique de l'amoxicilline par diffusion sur agar**

Cette expérience vise à repérer les changements dans les diamètres des zones d'inhibition lorsque la molécule d'antibiotique subit un traitement thermique à différentes températures.

Des boîtes de pétri sont ensemencées avec une charge suffisante de l'organisme d'essai (*Bacillus subtilis*), des disques en papier contenant une concentration d'antibiotique définie sont placés au centre de la gélose. Après 24h d'incubation, le diamètre de la zone de croissance inhibée autour du disque est mesuré. Le diamètre est influencé par plusieurs facteurs parmi lesquels on cite la concentration initiale de l'antibiotique (Jawetz 1999).

**6.1. Préparation de la solution d'amoxicilline (0.6 mg/ml)**

La solution d'antibiotique à examiner comprend une pesée de 60 mg d'amoxicilline mise dans une fiole de 100 ml étiquetée et stérilisée préalablement et complétée au volume avec de l'eau distillée (CE 1980)**.**

**6.2. Chauffage de la solution d'amoxicilline (0.6 mg/ml)**

5 tubes à essai préalablement stérilisés et étiquetés contenant 10 ml de la solution à examiner sont chauffés dans un bain marie à 35, 40, 60, 75, 90°C pendant 60, 50, 45, 30, et 15 minutes respectivement. Un tube contenant la même quantité de la solution reste non-chauffé et sert comme témoin.

**6.3. Diffusion sur Agar**

La gélose préalablement fondue est écoulée dans 6 boîtes de pétri. La suspension contenant *Bacillus subtilis* est prélevée et étalée à l'aide d'un écouvillon stérile sur la gélose de chaque boîte (témoin, 35°C, 40°C, 60°C, 75°C). 6 disques en papier sont immergés dans les solutions chauffées et placés chacun dans la boite de pétri qui le correspond, les boîtes sont ensuite incubées pour 24 heures. La mesure des diamètres des zones d'inhibition est réalisée à l'aide d'un pied à coulisse (CE 1980)**.**

## 7. Evolution de la biomasse bactérienne

L'estimation de la croissance bactérienne ou bien plus précisément la biomasse des bactéries en présence des produits de dégradation de l'amoxicilline dans le jus de viandes a été réalisée avec deux bactéries: *Escherichia coli* et *Paenabacillus phocaensis.*

La détermination de la biomasse a été réalisée selon la méthode de Pfefferle et *al.* (2000) avec quelques modifications, ou le support est une microplaque de 96 puits, et la distribution des biomasses bactériennes est associée directement aux quantités des échantillons contenant des produits de dégradations versés dans les puits portant les bactéries.

### 7.1. Réification des bactéries

Les deux bactéries, *Escherichia coli* et *Paenabacillus phocaensis* ont été stockées dans du glycérol 40% et à -20°C. Afin de les utiliser, un repiquage d' *E. coli* été réalisé sur le bouillon nutritif, et de *Paenibacillus phocaensis* sur le milieu TSB et puis incubés à 30±2°C pendant 48h.

Pour chaque culture, un volume de 1ml a été mélangé avec 3 ml de TSB *Paenibacillus phocaensis* et 3 ml du bouillon nutritif pour la souche *Escherichia coli.* Les tubes ainsi préparés ont été incubés à 30 °C pendant 24 h, ensuite ont été refroidis dans le réfrigérateur à 4°C.

### 7.2. Remplissage des puits

Pour la détermination de la biomasse des deux bactéries en présence des résidus d'amoxicilline nous avons utilisé les plaques de 96 puits (Fig. 9).

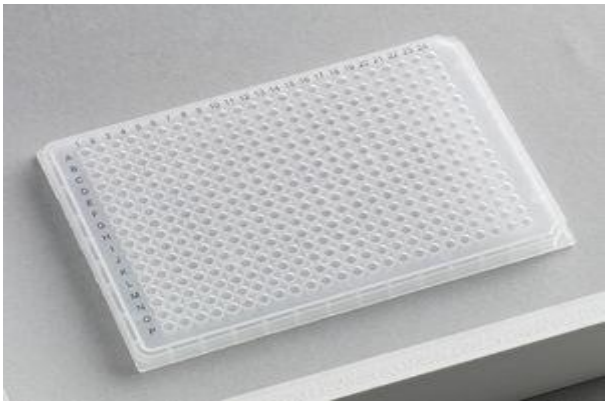


**Figure 9**: Une microplaque

Nos cinq échantillons [AMO (-), AMO (+), AMO(+) $_{150}$ , AMO(+)$_{120}$, AMO(+)$_{\mu\text{-ondes}}$] ont été utilisés comme étant des substrats pour la croissance des deux bactéries retenues.

Nous avons préparé différentes dilutions (0%, 25% et 50%) pour chaque échantillon (Tabl. VIII, IX et X). Dans chaque puit, 200 µl du mélange échantillon- milieu de culture a été placé puis 20 µl de la suspension bactérienne ont été ajouté.

**Tableau VIII.** Proportions de préparation des deux témoins *Escherichia coli et Paenabacillus phocaensis* (Milieu de culture : Bactérie v/v)

| **Milieu de culture (TSB/BN)** | **Suspension bactérienne** |
|---|---|
| **200 µl** | 20 µl |

**Tableau IX** : Proportions après ajout d'*E.coli* (Milieu de culture : Echantillon : *E.coli* v/v)

| **Concentration en échantillon (%)** | **Milieu de culture (TSB)** | **Echantillon** | **Suspension bactérienne** |
|---|---|---|---|
| **0%** | 200 µl | 0 µl | 20 µl |
| **25%** | 150 µl | 50 µl | 20 µl |
| **50%** | 100 µl | 100 µl | 20 µl |

**Tableau X** : Proportions après ajout de *Paenibacillus* (Milieu de culture : Echantillon : *Paenibacillus* v/v)

| **Concentration en échantillon (%)** | **Milieu de culture (BN)** | **Echantillon** | **Suspension bactérienne** |
|---|---|---|---|
| **0%** | 200 µl | 0 µl | 20 µl |
| **25%** | 150 µl | 50 µl | 20 µl |
| **50%** | 100 µl | 100 µl | 20 µl |

### 7.3. Incubation et lecture

La microplaque est incubée à 30°C pendant 3 jours, avec agitation orbitale fixée à 250 tr/min. La mesure de la DO est réalisée après 24h et 72h par le lecteur spectraMa à microplaques à 530 nm. Les mesures consistent à quantifier la biomasse cellulaire dans un volume de culture connu dans chaque puit de microplaques.

# RÉSULTATS

# &

# DISCUSSION

## I . Effet de l'amoxicilline sur la variation de poids

L'effet de l'amoxicilline sur le poids des 20 poussins sélectionnés pour cette étude a montré qu'il y'a une augmentation des poids avec l'ajout de l'amoxicilline au niveau de l'alimentation. En effet, les sujets témoins (qui n'ont pas reçu de l'amoxicilline) ont présenté un poids moyen initial de 614.25 $\pm$ 52.46 g et après 7 jours nous avons remarqué une augmentation de 27.10%. Cette augmentation de poids est significative à P<0.05 (Tab.XI). Cette augmentation de poids est due à la richesse de leur régime alimentaire qui est basé essentiellement sur la poudre de maïs contenant un pourcentage élevé en lipide et glucide (Han et Parsons 1987)

Le lot des sujets traité (qui ont reçu de l'amoxicilline) a présenté un poids moyen initial de 651.94 $\pm$51.06 g et après 7 jours, nous avons marqué une augmentation significative à P<0.05 (Tab.XI) de 34.39% en comparant avec le poids moyen initial. Cette augmentation de biomasse confirme que l'utilisation de mais comme régime alimentaire a un effet positif.

Afin de déterminer l'effet de l'ajout de l'amoxicilline dans le régime alimentaire des poulets nous avons comparé les poids finaux entre les sujets témoins et les sujets traités (Tab.XI).

**Tableau XI :** Effet de l'amoxicilline sur le poids des poussins

| | **P sujets témoin (g)** | | **P sujets traités (g)** | |
|---|---|---|---|---|
| | J0 | J7 | J0 | J7 |
| Pm (g) | 614.25+52.46 | 780.75+52.46 | 651.94+51.06 | 876.19+51.06 |
| *S2* | 2752.917 | 7466.25 | 2607.263 | 5474.43 |
| *n* | -- | 4 | -- | 16 |
| *d.d.l* | | 18 | | |
| $\|t\|$ | | **2.2405** | | |

La différence de poids moyens entre les deux groupes est significative car la valeur *t* est supérieure à la valeur critique lu sur la table *t* à P<0.05 (annexe 4). Par conséquent, l'hypothèse que l'amoxicilline peut être utilisée comme molécule promotrice de croissance est approuvée. Un promoteur de croissance se définit comme des substances anabolisantes permettant d'accroître la masse musculaire, à des fins d'amélioration de performance physique et/ou économique (Dibner et Rcihards 2005).

En dépit du fait que l'amoxicilline n'est pas classée parmi les molécules promotrices de croissance (Patrick et *al.* 2003), nos résultats rend appuient son utilisation à titre préventif pour éviter un grand nombre d'infections réduisant le poids ou causant des mortalités lors de la

période d'élevage, est un facteur qui aide à améliorer l'efficacité d'élevage et le rendement en chair comestible, par conséquent, augmenter les revenus de l'éleveur.

## II. Recherche des résidus de l'amoxicilline

La recherche des résidus de l'amoxicilline a été faite par la méthode de turbidimétrie. La turbidité augmente lors de la multiplication bactérienne et diminue en présence de l'antibiotique dans les solutions.

Nos résultats (Fig.10) ont montré un changement observé à l'œil nu dans la turbidité du milieu de culture TSB avant et après incubation des tubes à essai contenant une culture de *Bacillus subtilis* et 1 ml de jus de viande extraite de chaque échantillon.

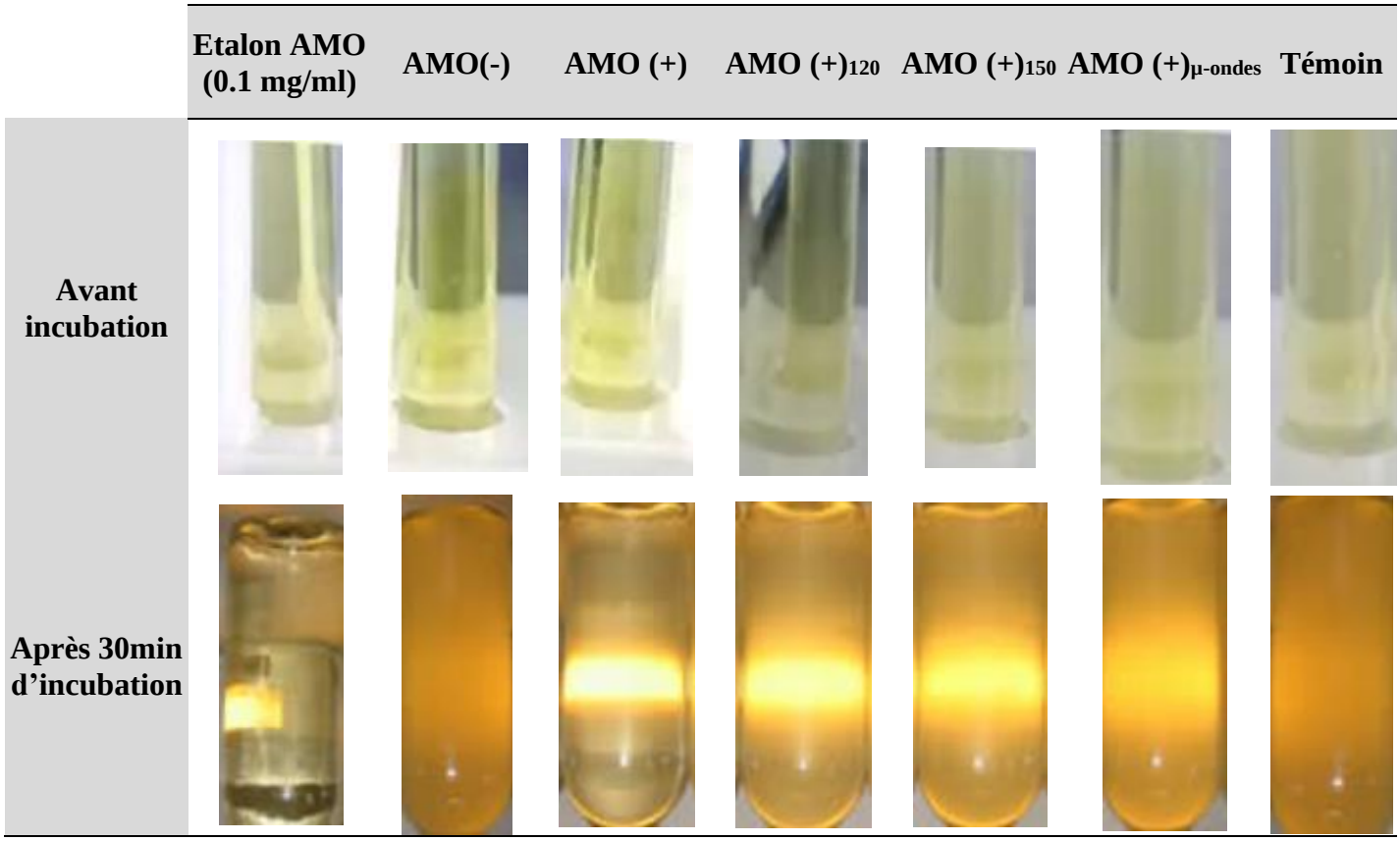



**Figure 10 :** Aspect du milieu de culture avant et après incubation.

L'aspect du milieu de culture a montré une turbidité de la solution qui s'intensifie lorsque la température de cuisson augmente, et qui se rapproche de celle remarquée dans l'échantillon AMO (-) exempte d'antibiotique. Par contre, le tube AMO (+) contenant le jus de viande traitée non-cuite montre une turbidité peu visible, et cela affirme la dégradation de l'amoxicilline dans les échantillons positifs cuits après un traitement thermique.

Dans le but de vérifier la turbidité des échantillons remarquée visiblement, nous avons procédé à une lecture faite à deux reprises par un spectrophotomètre (Tab.XII).

**Tableau XII :** Détermination de la densité optique des solutions après 5h d'incubation

| | **Etalon (0.1 mg/ml)** | **AMO(-)** | **AMO(+)** | **AMO(+)$_{120}$** | **AMO(+)$_{150}$** | **AMO (+)$_{\mu\text{-ondes}}$** | **Témoin** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1ère lecture | 0,057 | 0,208 | 0,107 | 0,154 | 0,219 | 0,225 | 0,203 |
| 2 ème lecture | 0,054 | 0,235 | 0,095 | 0,146 | 0,211 | 0,221 | 0,225 |

Une faible turbidité est traduite par une petite valeur d'absorbance, donc une forte concentration en antibiotique. Dans nos échantillons, l'absorbance la plus faible enregistrée concerne la solution AMO (+) avec une valeur de 0.107, cette valeur est supérieure à l'absorbance donné par l'étalon concentré en amoxicilline (0.057) et inferieure à celles de la solution « témoin » et de la solution AMO (-) exemptes d'antibiotique (0.203 et 0.208 respectivement), cela confirme la présence d'une concentration élevée d'antibiotique dans l'échantillon AMO (+) non-cuit**.**

Les solutions AMO (+)$_{120}$ et, AMO (+)$_{150}$, AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ ont donné des valeurs d'absorbance d'ordre accroissant (0.154, 0.219, 0.225 respectivement). Ces résultats indiquent que le traitement thermique appliqué sur les échantillons cuits a un effet sur la concentration d'antibiotique initiale présente dans le muscle de poulet. L'absorbance la plus élevée a été enregistrée chez la solution AMO (+) $_{\text{u-onde}}$ signifie qu'un traitement à la microonde est le type de cuisson le plus efficace pour la réduction de l'effet inhibiteur, voir la dégradation de la molécule d'amoxicilline.

En deuxième lecture, les valeurs d'absorbance des solutions AMO (+), AMO (+)$_{120}$ et, AMO (+)$_{150}$, AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ et la solution d'étalon ont diminué à cause de l'action continue de l'antibiotique contre la bactérie présente dans ces solutions. Néanmoins, pour l'échantillon AMO (-) et la solution « témoin » qui ne contiennent pas d'antibiotique, l'absorbance a augmenté, ce qui indique que les germes ont pu se multiplier encore en absence de l'antibiotique.

L'ensemble des résultats obtenus montre que les traitements thermiques que nous avons appliqué a affecté la teneur initiale en amoxicilline dans nos échantillons, et que l'effet inhibiteur de d'amoxicilline diminue par destruction ou transformation de la molécule d'antibiotique.

Les résultats d'une étude menée en 2015 traitant les résidus d'oxytétracyline dans le poulet frais et cuit sont en accord avec nos résultats, démontrant une augmentation d'absorbance, une diminution de concentration de l'antibiotique par conséquent quand la température de cuisson

augmente, une autre affirmation que certaines molécules d'antibiotiques sont sensibles et thermodégradables par la chaleur de cuisson (Slama 2015).

## III. Identification et quantification des résidus par HPLC

### 1.Identification

L'identification des résidus d'amoxicilline après un traitement thermique par différentes méthodes de cuisson a été effectuée par la méthode de HPLC.

En HPLC l'identification d'un composé présent dans un mélange est faite selon le temps de rétention de son pic après injection d'une solution dite solution d'étalon contenant uniquement la molécule recherchée à son état pure (Lough 1995).

Nos résultats ont montré que pour la solution étalon (Fig.11), un seul pic dans le temps de rétention 6.64 minutes est apparu. Ce pic correspond à celui de la molécule d'amoxicilline.

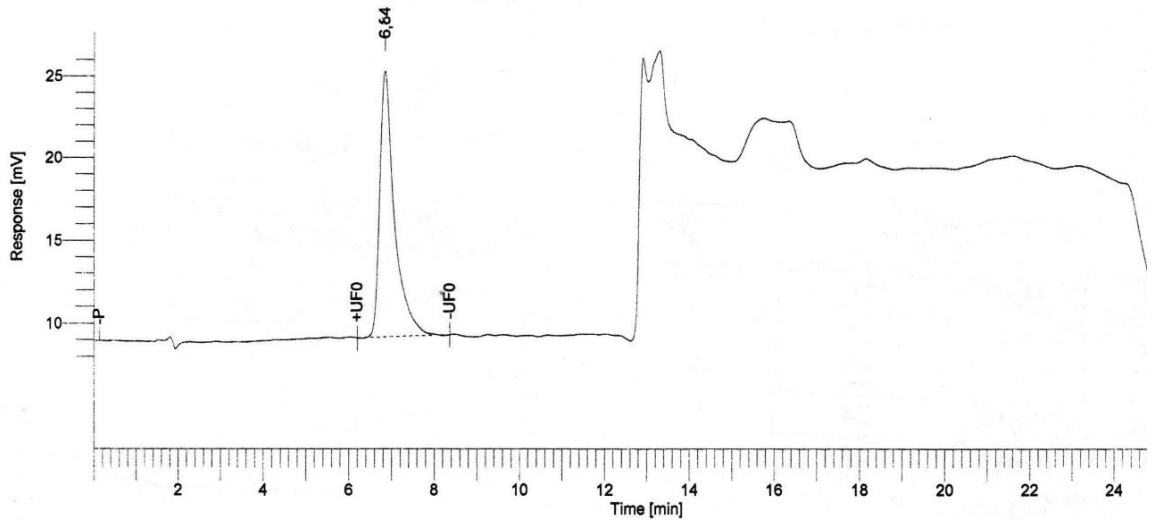



**Figure 11:** chromatogramme obtenu après analyse de la solution d'étalon

Les pics de la molécule d'amoxicilline -si existante- dans nos échantillons sont censés d'apparaitre en même temps de rétention (~ 6.64 minutes) que celui du pic de la solution d'étalon, et l'aire (surface) de chaque pic correspond à une concentration qui sera calculée dans l'étape de quantification.

Pour la solution AMO (-), nous avons noté l'absence totale de l'amoxicilline dans les tissus des sujets qui n'ont pas reçu de l'amoxicilline. Le chromatogramme de la solution AMO (-) ne contient aucun pic signifiant la présence d'une molécule détectable avec les conditions chromatographiques utilisées (Fig.12).

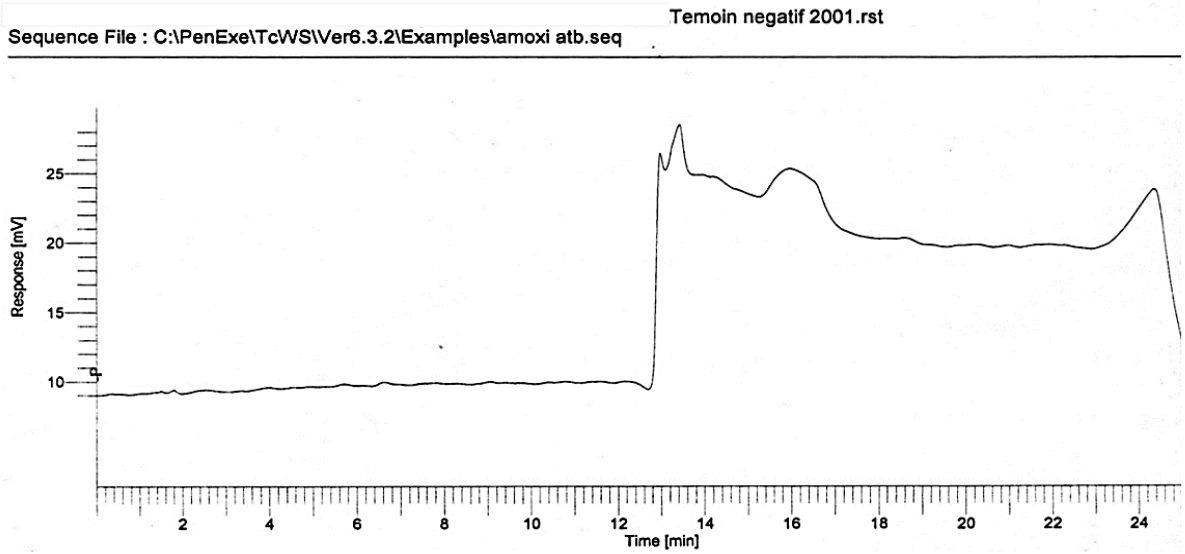



**Figure 12:** chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (-)

Pour la solution AMO (+), nous avons marqué l'apparition de 3 pics (Fig.13) qui ont des temps de rétention antérieures à celui de pic de l'amoxicilline de la solution d'étalon: 1.49, 1.64, et 2.73 minutes respectivement. Nous avons noté aussi l'absence totale d'un pic à ~ 6.64 minutes. Selon le monographe de l'amoxicilline (Annexe 6) dans la pharmacopée américaine (USP, 2017) ces 3 pics correspondent à la présence des substances relatives à l'amoxicilline, issues de la dégradation totale ou à la transformation de ce dernier en autres composés dans les sujets traités non-cuits.

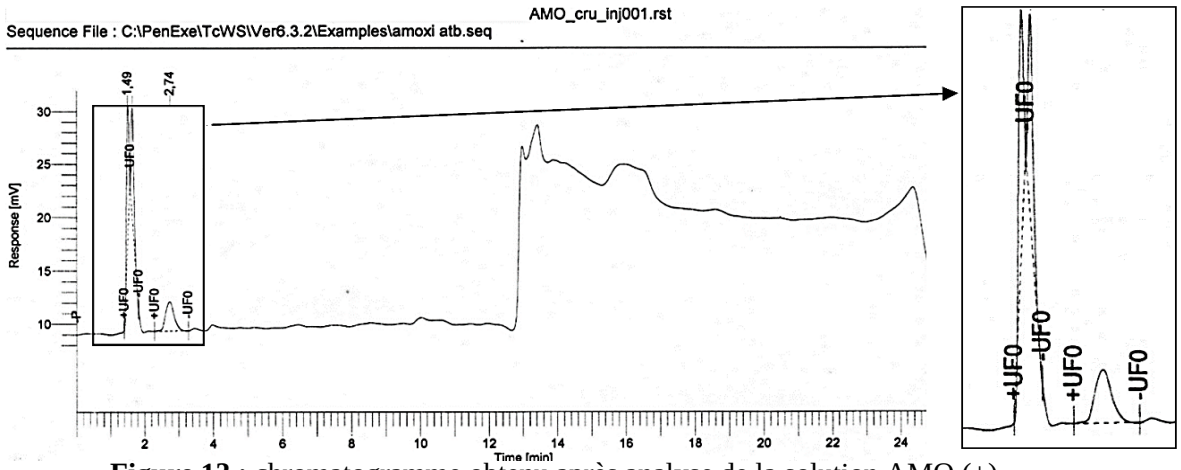



**Figure 13 :** chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (+)

Pour la solution AMO $(+)_{120}$ (Fig.14), les mêmes pics précédents sont apparus avec temps de rétention similaires (1.51, 1.65, et 2.77 minutes respectivement) mais ont présenté une surface moins importante. La variation de tailles de pics est une indication d'un changement de la concentration des composés retenus, une diminution de concentration dans le cas de viande des sujets traités cuite à 120 °C par rapport aux concentrations des composés retenus en solution d'échantillons traités non-cuits.

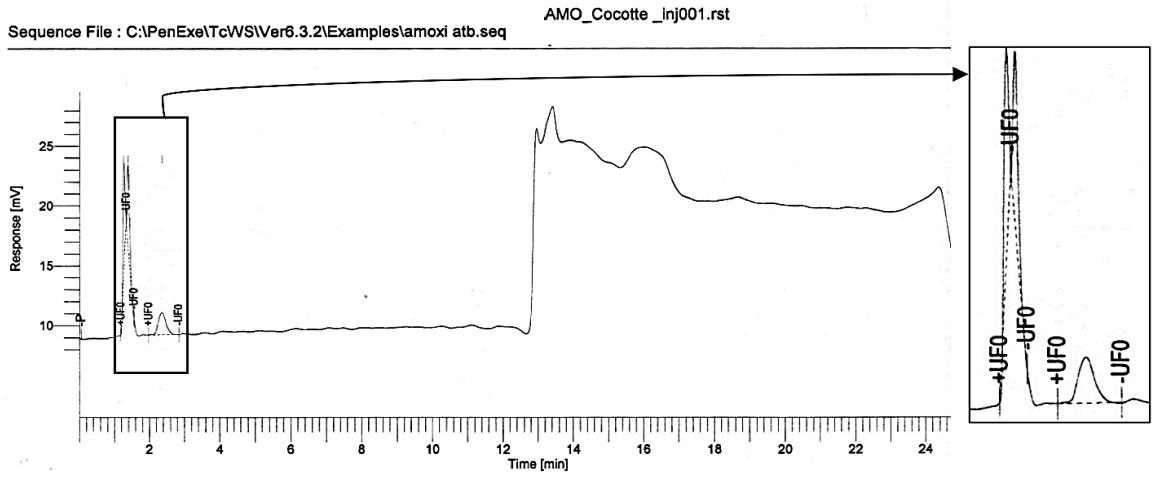



**Figure 14 :** chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO $(+)_{120}$

Dans les solutions AMO $(+)_{150}$ (Fig.15) et AMO $(+)_{\mu\text{-ondes}}$ (Fig.16), nous avons remarqué l'apparition d'un nouveau pic (~ 2.12 minutes) en plus de ceux détectés dans les solutions AMO (+) et AMO $(+)_{120}$, cela est dû peut-être à une transformation des autres produits en nouvelle molécule quand la viande est exposée à une chaleur relativement forte, comparée à la chaleur moins intense du traitement que l'échantillon AMO $(+)_{120}$ a subi.

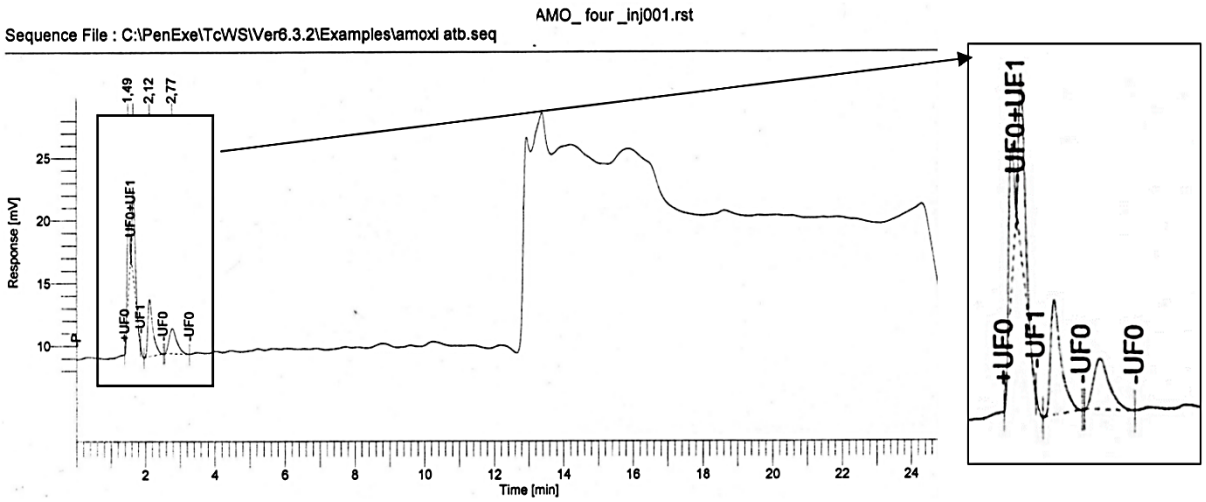



**Figure 15:** chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO $(+)_{150}$

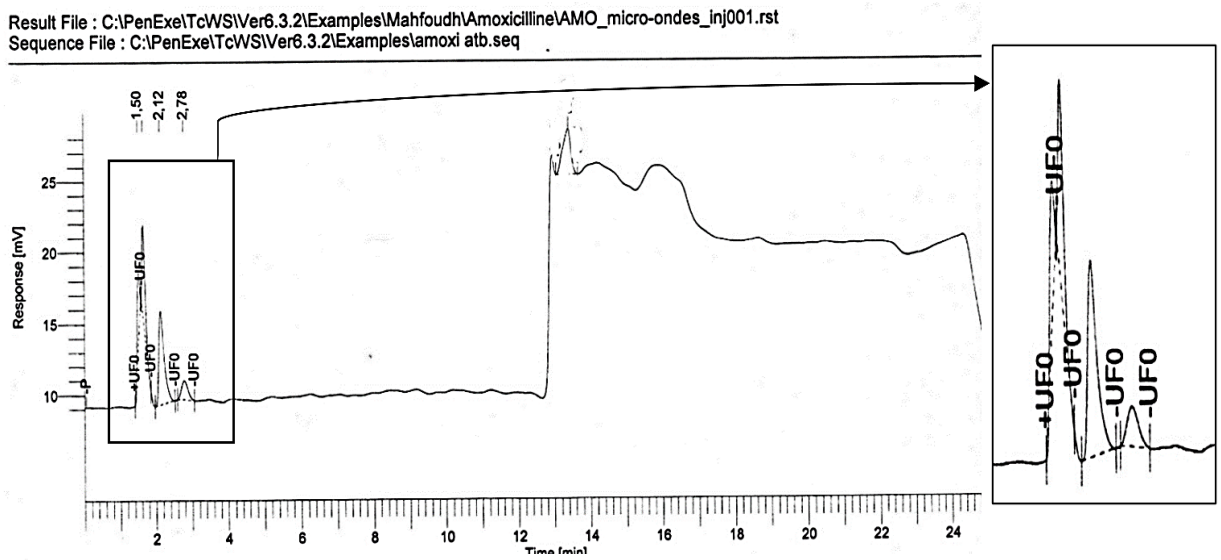



**Figure 16:** chromatogramme obtenu après analyse de la solution AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$

Dans le but de confirmer l'absence de pics relatifs à des impuretés présentes dans les solvants et les réactifs utilisés et qui peuvent être confondus avec les pics de produits de dégradations de l'amoxicilline dans les chromatogrammes, on a injecté le tampon pH 5 dans lequel on a fait l'extraction des échantillons (Fig. 17).

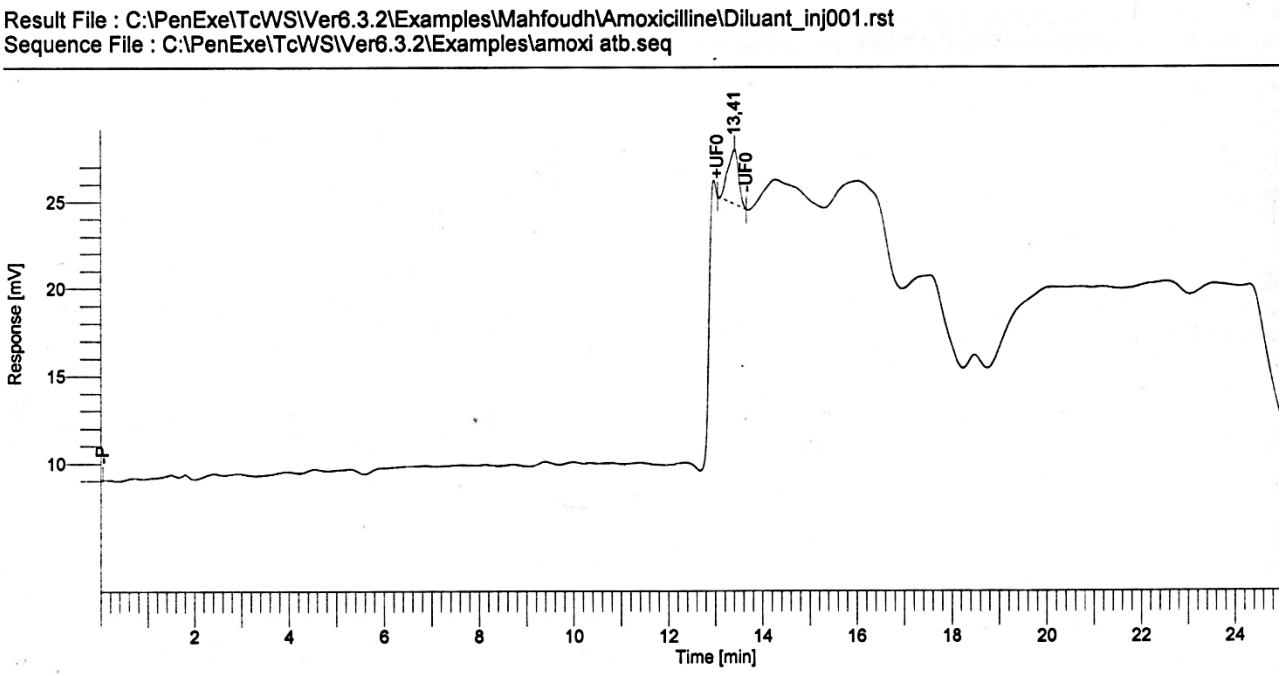



**Figure 17** : chromatogramme obtenu après injection du tampon pH 5

Un seul pic a été signalé (~ 13.5 minutes) après l'injection du tampon pH 5, et il a été exclu de l'intégration des chromatogrammes des échantillons et de la solution d'étalon.

Aucun pic correspondant à l'amoxicilline n'a été repéré dans nos échantillon traités cuits et non-cuits, indiquant l'instabilité de la molécule même en conditions normales. Ce résultat est en accord avec les travaux de Furi (2018) qui a montré qu'aucune trace d'amoxicilline n'a été retrouvée dans des échantillons de poulet trempés au préalable dans une solution de 0.2 ppm d'amoxicilline.

L'identification des pics des substances relatives à l'amoxicilline a été réalisé en se basant sur les temps de rétention relatifs présentés dans l'annexe 6 (USP, 2017). Le temps de rétention relatif est le rapport entre le temps de rétention du composé à identifier et le temps de rétention du pic de l'amoxicilline obtenu lors de l'analyse de la solution d'étalon (eq.1).

$$TR_r = \frac{TR_c}{TR_e} \qquad (\text{eq. } 1) \text{ (USP, 2017)}$$

$TR_r$ : temps de rétention relatif

$TR_c$ : temps de rétention de composé à identifier (minutes)

$TR_e$ : temps de rétention d'amoxicilline étalon (~ 6.64 minutes)

Le tableau XIII comprend les temps de rétention relatifs aux produits détectés lors de l'analyse des échantillons. Les produits sont désignés *a*, *b*, *c* et *d* suivant l'ordre de leur temps de rétention.

**Tableau XIII: Temps de rétention relatifs aux composés détectés dans les échantillons**

| Produits | Temps de rétention (min) | Echantillons | Temps de rétention relatif |
|---|---|---|---|
| ***a*** | ~ 1.50 | AMO (+), AMO (+) $_{120}$, AMO (+) $_{150}$, AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ | 0.22 |
| ***b*** | ~ 1.60 | AMO (+), AMO (+) $_{120}$, AMO (+) $_{150}$, AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ | 0.23 |
| ***c*** | ~ 2.12 | AMO (+) $_{150}$, AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ | 0.32 |
| ***d*** | ~ 2.75 | AMO (+), AMO (+) $_{120}$, AMO (+) $_{150}$, AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ | 0.40 |

A partir des temps de rétention relatifs calculés, nous avons identifié un seul produit de dégradation présent dans les échantillons AMO (+) $_{150}$ et AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ . Il s'agit du pic qui a un $TR_r$ égale à 0.32, conformément au $TR_r$ fixé par l'USP du produit *D-hydroxyphenylglycine* (annexe 6).

L'hydrophenylglycine (autrement appelée l'*oxfenicine*, en ces deux formes D et L) est une substance biologiquement active issue fréquemment de la synthèse de l'amoxicilline. Elle est connue de ses effets toxicologiques tel que l'irritation des muqueuses gastriques si avalée ou consommée sous forme de résidus introduits dans l'alimentation en grandes quantités (NCBI 2021).

Pour les trois autres produits restants (*a*, *b* et *d*) leur identification a été non-spécifiés (ou non-monographiés) dans l'USP, dont la toxicité reste inconnue, ce qui nécessite l'utilisation d'une spectroscopie de masse.

**2. Quantification**

Afin de quantifier les produits de dégradation de l'amoxicillines, nous avons calculé la teneur des solutions en résidus ou en produits de dégradation selon le rapport des aires standardisé par les pharmacopées américaines (eq.2) (USP, 2017).

$$C_p = \frac{Aire_p}{Aire_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_{ech}} \times P_{std} \qquad (\text{eq. } 2)$$

$C_p$ : concentration de chaque produit de dégradation retenu (µg/mg)

$Aire_p$ : aire de pic de produit de dégradation

$Aire_{std}$ : aire de pic de l'amoxicilline obtenu de l'étalon

$C_{std}$ : concentration de la solution d'étalon d'amoxicilline (mg/ml)

$C_{ech}$ : concentration globale de la solution d'échantillon (mg/ml)

$P_{std}$ : puissance (pureté) de l'amoxicilline étalon (µg/mg) (**annexe 5**)

**Tableau XIV :** Données nécessaires pour le calcul des concentrations des produits de dégradation dans chaque solution

| | | | | | ***Aires*** $_p$ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Aire*** $_{std}$ | $C_{std}$ [*] **(mg/ml)** | $P_{std}$ **(µg/mg)** | $C_{ech}$ [**] **(mg/ml)** | **Produits** | **AMO (+)** | **AMO (+)** $_{120}$ | **AMO (+)** $_{150}$ | **AMO (+)** $_{\mu\text{-ondes}}$ |
| 381977 | 0.05 | 879.70 | 20 | *a* | 62723 | 46887 | 20112 | 10104 |
| | | | | *b* | 55070 | 46112 | 40406 | 20003 |
| | | | | *c* | -- | -- | 46964 | 67081 |
| | | | | *d* | 47209 | 46312 | 11328 | 10938 |

[*] $C_{std} = \frac{50\ mg}{100\ ml} \times \frac{1\ ml}{10\ ml} = 0.05\ mg/ml$ [**] $C_{ech} = \frac{1000\ mg}{10\ ml} \times \frac{5\ ml}{25\ ml} = 20\ mg/ml$

Les concentrations des produits de dégradation et le taux de leur destruction/transformation (variation de concentration) dans chaque échantillon sont présentées dans le tableau XV.

**Tableau XV :** Concentrations des produits de dégradations en (µg/mg) de l'amoxicilline et leur variation (%)

| | **AMO (+)** | **AMO (+) $_{120}$** | **AMO (+) $_{150}$** | **AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$** |
|---|---|---|---|---|
| $C_a$ | 0.361 | 0.270 | 0.116 | 0.058 |
| Variations $C_a$ | -- | **-25.21** | **-67.86** | **-83.93** |
| $C_b$ | 0.317 | 0.265 | 0.233 | 0.115 |
| Variations $C_b$ | -- | **-16.40** | **-26.50** | **-63.72** |
| $C_c$ | -- | -- | 0.270 | 0.386 |
| Variations $C_c$ | -- | -- | -- | **+42.96** * |
| $C_d$ | 0.272 | 0.267 | 0.065 | 0.063 |
| Variations $C_d$ | -- | **-1.83** | **-76.10** | **-76.83** |
| $\sum C_{(a,b,c,d)}$ | **0.950** | **0.802** | **0.684** | **0.623** |
| **Variations** $\sum C_{(a,b,c,d)}$ | -- | **-15.58** | **-28.00** | **-34.42** |

* Variation calculée par rapport au $C_c$ de la solution AMO (+) $_{150}$

L'analyse des données obtenues nous a permis de constater que les concentrations des produits détectés sont fortement influencées à la fois par la température et le type de cuisson. Les quantités de chacun des produits *a*, *b* et *d* dans les solutions AMO (+) $_{120}$ et AMO (+) $_{150}$ diminuent au fur et à mesure de l'augmentation de température de cuisson et atteignent une diminution de 67.86, 26.50, 76.10% respectivement lorsque la viande est cuite à 150°C. Cette diminution de concentration peut se lier à une destruction, ou à une transformation de ces produits en autres molécules, et l'apparition du produit *c* (*D-hydroxyphenylglycine*) dans l'échantillon AMO (+) $_{150}$ avec une concentration importante (0.27 µg/mg) appuie cette hypothèse.

En terme de destruction par voie thermique, la cuisson en courte durée (10 minutes) par micro-ondes à 1200w s'est avérée la plus efficace, avec un taux de destruction dépassant les 34% de la quantité totale des produits de dégradation dans l'échantillon AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$, malgré le fait que la solution contient une grande concentration (0.386 µg/mg) du produit *c*, qui marquait une augmentation d'environ 43% par rapport au quantité premièrement repérée dans la solution AMO (+) $_{150}$ (possibilité d'une transformation continue des autres produits en *D-hydroxyphenylglycine*). La cuisson par four à 150°C pendant 25 minutes vient en deuxième place avec une diminution de 28% de la teneur totale de l'échantillon en produits de dégradation. Les produits de dégradation semblent moins touchés avec la cuisson à 120°C, montrant une réduction de concentration totale de seulement 15%.

La concentration très élevée (950 µg/g) des résidus de l'amoxicilline dans l'échantillon AMO (+) non-cuit est expliquée par les fortes doses de médicament données aux animaux avant l'abattage, et le fait qu'elle garde une valeur supérieure à 0.05 µg/g décrite par l'FAO/OMS après traitement thermique intense signifie qu'une cuisson ménagère ne sera pas suffisante pour détruire les résidus et rendre la viande salubre pour la consommation, si l'amoxicilline est administré d'une manière abusive dans les élevages.

En se basant sur les résultats de la détection par turbidimétrie, nous avons constaté que les produits de dégradations de l'amoxicilline ont toujours un effet contre certaines bactéries telles que *B. subtilis*, et qu'ils peuvent dans ce cas, contribuer à la résistance aux antibiotiques en cas où il existe des germes pathogènes sensibles à ce type de résidus.

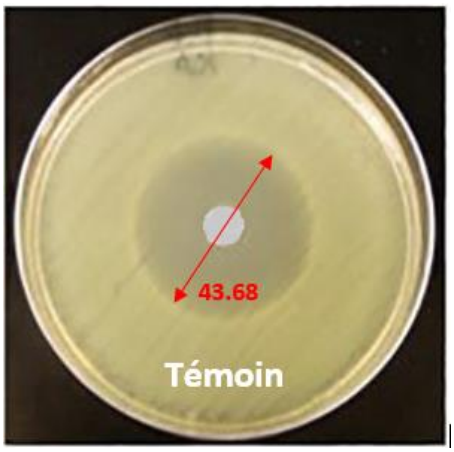
D'après Ibrahim et Moats (1994), une cuisson de la viande pendant 30 minutes à 100°C permet la dégradation totale des résidus d'oxytétaracycline. Quant à nos résultats, la cuisson en courte durée (10 minutes) par micro-ondes à 1200w détruit plus de 34% de la quantité totale des produits de dégradation dans l'échantillon AMO (+) $_{\mu\text{-ondes}}$ et cela est soutenu par Van Egmond et *al.* (2000), qui ont trouvé que la destruction des résidus d'oxytétracycline est partielle (53%) et les résidus sont plus au moins stables même s'ils subissent une procédure de cuisson à 130°C pendant 20 minutes.

## IV. La cinétique par diffusion sur agar

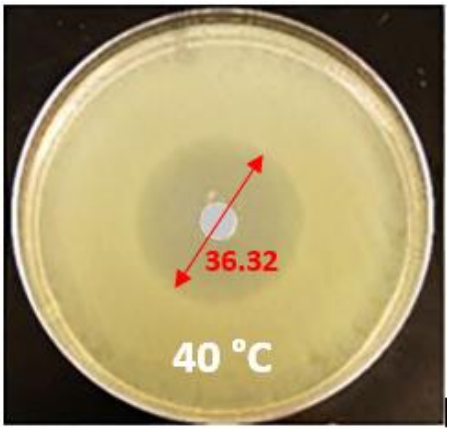
L'étude du comportement de l'amoxicilline, plus précisément son effet inhibiteur, a été réalisé après l'avoir exposé à un traitement thermique à différentes températures.

Dans le test de diffusion sur Agar, un mince film de bactéries ensemencées sur une gélose est soumis à un antibiotique. La zone d'inhibition est une zone circulaire autour de l'endroit sur la gélose où se trouve l'antibiotique dans laquelle des colonies de bactéries ne se développent pas (Bhargav *et al.* 2016).

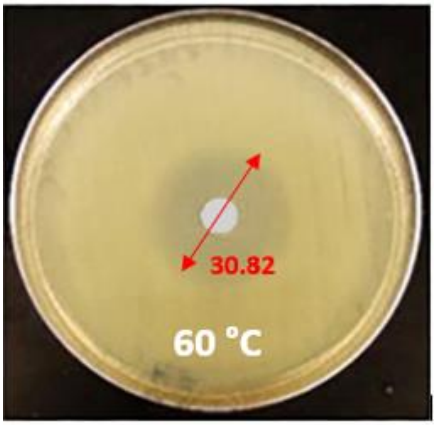
Les résultats (Fig.18) ont montré qu'avec la solution témoin non-chauffé, nous avons obtenu un diamètre de la zone d'inhibition de 43.68 mm. Une réduction flagrante en fonction de la température est remarquée dans les diamètres des solutions chauffées ; en effet, à 35°C le diamètre de la zone d'inhibition a passé à 38.34 mm, et ça diminue progressivement pour y arriver jusqu'à 23.27 mm à 90°C .



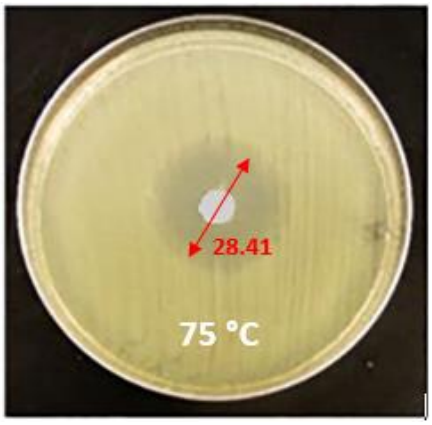

**a**



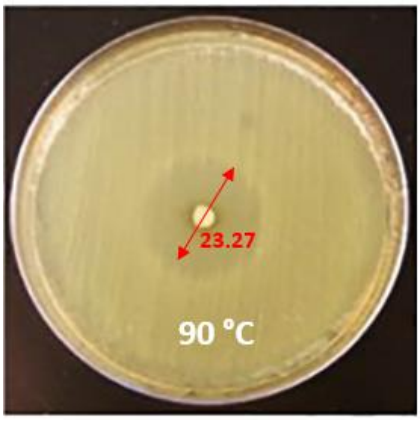

**b**




**c**




**d**




**e**

**Figure 18 : diamètres des zones d'inhibition de la solution témoin (a) et des solutions chauffées (b, c, d, e) obtenues après incubation.**

Le calcul des variations des diamètres de zones d'inhibition des solutions d'amoxicilline chauffée par rapport au diamètre de la solution témoin non-chauffée permet de faire une évaluation approximative des taux de dégradation de la concentration initiale d'antibiotique par voie thermique (Tab.XVI).

**Tableau XVI : Variations des diamètres des zones d'inhibition en fonction de la température et du temps**

| | **Témoin** | **Solut. 1** | **Solut. 2** | **Solut.3** | **Solut.4** | **Solut.5** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **T (°C)** | -- | 35 | 40 | 60 | 75 | 90 |
| **Durée (min)** | -- | 60 | 50 | 45 | 30 | 15 |
| **Ø (mm)** | 43.68 | 38.34 | 36.32 | 30.82 | 28.41 | 23.27 |
| **Variation (%)** | **--** | **-12.22** | **-16.85** | **-29.44** | **-37.25** | **-46.72** |

Les zones d'inhibition se rétrécissent donc la concentration initiale en antibiotique diminue quand la température est de 35°C ou plus. Nous avons noté une réduction d'environ 30% du diamètre quand la molécule est chauffée à 60°C pendant 45 minutes. Un chauffage à 90 °C pendant 15 minutes a produit une zone d'inhibition de 23,27 mm, soit une réduction de plus de 45% par rapport à celle du témoin. Ces variations des diamètres d'inhibition est une affirmation que l'amoxicilline est thermo-dégradable et que son activité inhibitrice diminue quand la température augmente, mais il convient de rappeler qu'il est probable que cette molécule peut subir une transformation sous l'action de la chaleur en autres composés également actifs contre les microorganismes, comme indiqué dans les parties « quantification des résidus par HPLC et détection par turbidimétrie ». Cette hypothèse est soutenue aussi par les résultats des travaux de Moats (1998) et qui a trouvé qu'une température modérée (chauffage à 90°C pendant 10 minutes) n'est pas suffisante pour l'inactivation entière des molécules d'antibiotiques les plus sensibles telles que la pénicilline G (un taux destruction de seulement 10%).

## V. Evolution de la biomasse bactérienne

Etude de l'effet de l'amoxicilline sur la croissance de *Paenibacillus phocaensis* et d'*Escherichia coli* a été réalisé avec différentes concentration du jus de viande obtenus après extraction des échantillons.

### 1. Résultats après 24h d'incubation

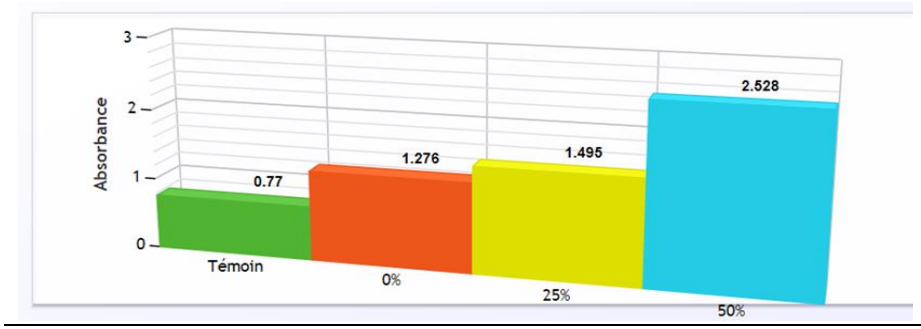
Nos résultats (Fig.19a) ont montré qu'en présence du jus de viande exempte d'antibiotique [AMO (-)], *Paenibacillus phocaensis* a une forte augmentation de croissance ou de multiplication par rapport au témoin, ou la bactérie a été inoculé sur le milieu de culture seulement. Cette augmentation de croissance est en fonction de la concentration du jus de viande dans le milieu, elle arrive à son maximum (2.52) à une concentration de 50 % soit une augmentation de 227%. Le jus de viande peut être considéré de ce fait comme un milieu riche en nutriment pour la croissance de *Paenibacillus phocaensis*. En ce qui concerne *Escherichia coli*, la souche comporte de la même manière que *Paenibacillus phocaensis* en présence de jus de viande de la solution AMO (-) (Fig.20a), montrant une augmentation de plus de 500% avec une absorbance de 2.48, par rapport au celle du témoin (0.467).

Dans les milieux contenant les résidus d'amoxicilline issus de viande cuites [AMO (+) $_{120}$, AMO (+) $_{150}$ et AMO (+) $_{\mu\text{-onde}}$] et obtenus après dégradation de la molécule sous l'effet du traitement thermique, la croissance de *Paenibacillus phocaensis* a montré également une augmentation par rapport au témoin, cette augmentation est de 77% avec AMO (+) $_{120}$, 71% avec AMO (+) $_{150}$ et 76% avec AMO (+) $_{\mu\text{-onde}}$ à une concentration de 50% (Fig.19c,d et e). La croissance d'*Escherichia coli* a marqué aussi une augmentation par rapport au témoin ; de 68% avec AMO (+) $_{120}$, 193% avec AMO (+) $_{150}$ et 236% avec AMO (+) $_{\mu\text{-onde}}$ à une concentration de 50% (Fig.20c, d et e). La croissance de *Paenibacillus phocaensis* n'est pas assez importante comme dans le milieu contenant le jus AMO (-) nous fait conclure que les résidus d'amoxicilline n'ont pas pu être utilisé comme nutriments par *Paenibacillus phocaensis*. L'incapacité d'une bactérie à utiliser un composant peut être due soit à l'absence des enzymes nécessaire à leur dégradation en métabolites ou à la nécessité d'une période d'adaptation dite période de latence (Briand 2007). Par contre, *E. coli* a marqué une multiplication remarquable dans les milieux contenant AMO (+) $_{150}$ et AMO (+) $_{\mu\text{-onde}}$, cela peut se lier à l'aptitude de cette dernière à utiliser un des produits de dégradations de l'amoxicilline résultant d'un traitement thermique à une température au-delà de 120°C, un tel résultat peut être corrélé avec les résultats d'identification et quantification des résidus par HPLC, affirmant la transformation continue

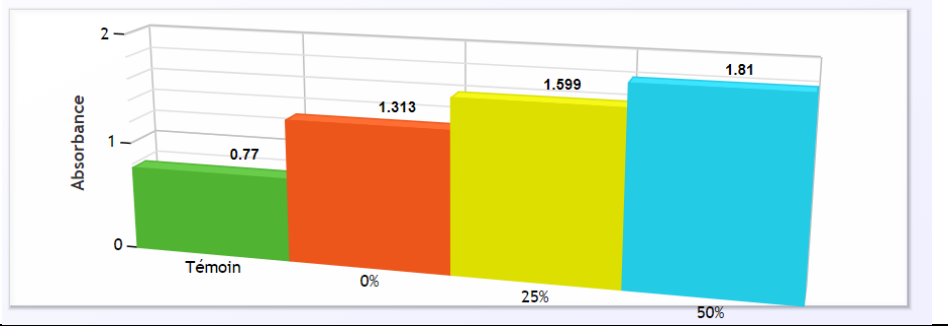
des composés complexes en composés plus simple et facilement assimilables par certains germes tel que *E. coli.*

La croissance de *Paenibacillus phocaensis* en présence de la solution AMO (+) contenant les produits de dégradation qui n'ont pas subi un traitement thermique (Fig.19b), a montré une augmentation par rapport au témoin et les solutions[AMO (+) $_{120}$, AMO (+) $_{150}$ et AMO (+) $_{\mu\text{-onde}}$]: nous avons obtenu une valeur de 1.81 avec une concentration de 50% du jus de viande, soit une augmentation de 135%. Du même manière, la multiplication d'*Escherichia coli* avec la même solution (Fig.20b) a montré une augmentation par rapport au témoin (0.467), une valeur de 1.40 a été enregistrée avec une concentration de 50% du jus de viande, soit une augmentation de 197%. Cette augmentation de biomasse peut être expliquée par la capacité de *Paenibacillus phocaensis* et d'*Escherichia coli* à utiliser les produits de dégradations dans cette solution comme nutriments et aussi par leur résistance à l'effet de l'antibiotique.

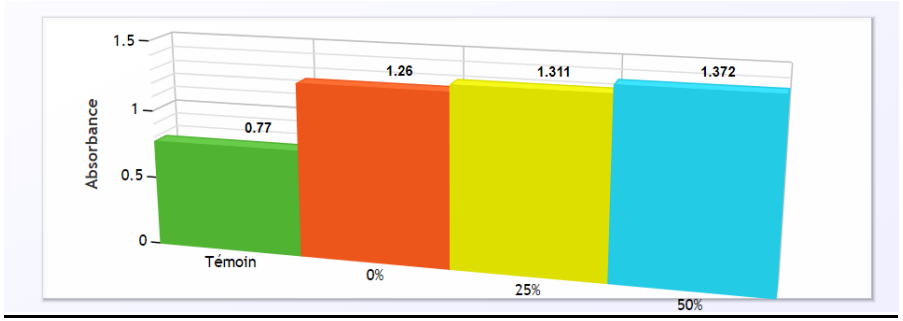
La dégradation bactérienne d'amoxicilline et ses produits de dégradations se fait par les bactéries possédant la β- Lactamase. En effet, Plusieurs espèces bactériennes présentent des résistances préoccupantes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Pseudomonas aeruginosa* , *Acinetobacrer baumannii* ), mais trois bacilles à Gram négatif de la famille des entérobactéries présentent une évolution de leur résistance aux β-lactamines remarquable. Ces bactéries ( *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* ) mettent en œuvre une grande diversité d'enzymes (plus de quatre cents, toutes caractérisées au niveau moléculaire), dérivant de quelques enzymes ancestrales, inactivant progressivement les antibiotiques les plus récents qui leur sont opposés et démontrant sans ambiguïté le rôle de l'antibiothérapie dans leur sélection (ANSM 2017).



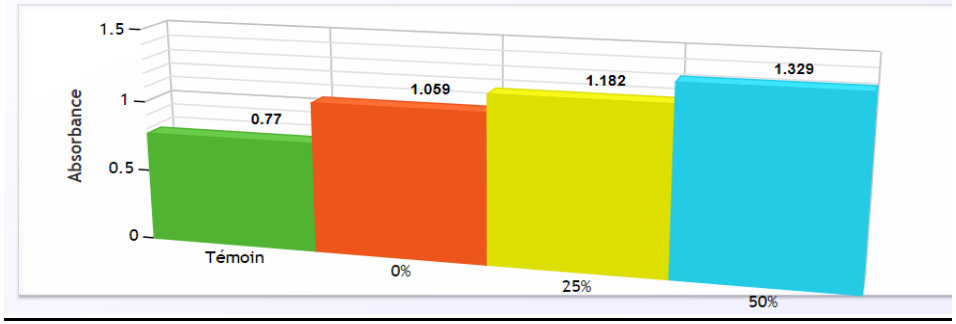

**a. AMO (-)**



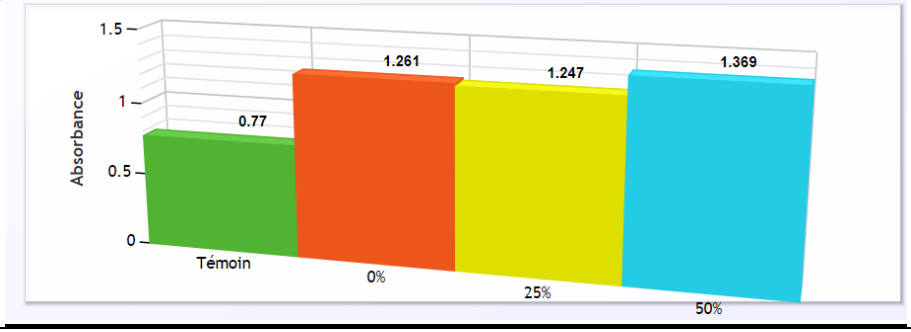

**b. AMO (+)**




**c. AMO (+) $_{120}$**

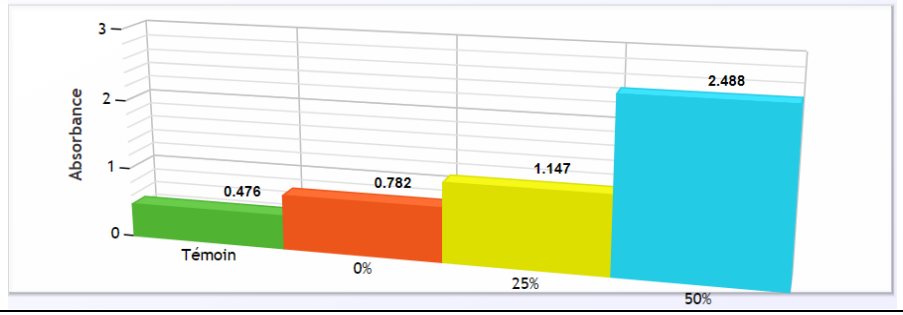



**d. AMO (+) $_{150}$**

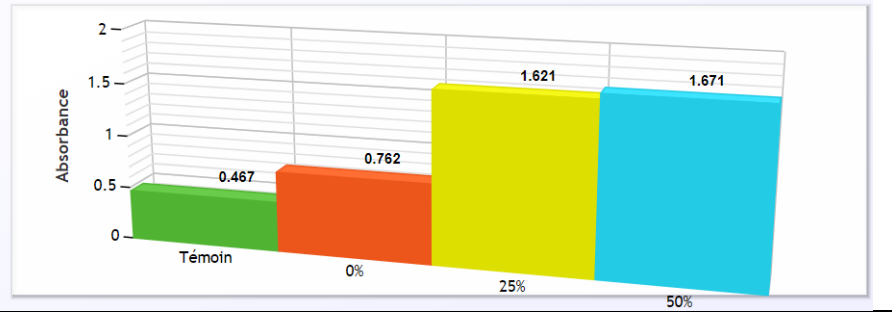



**e. AMO (+) µ-ondes**

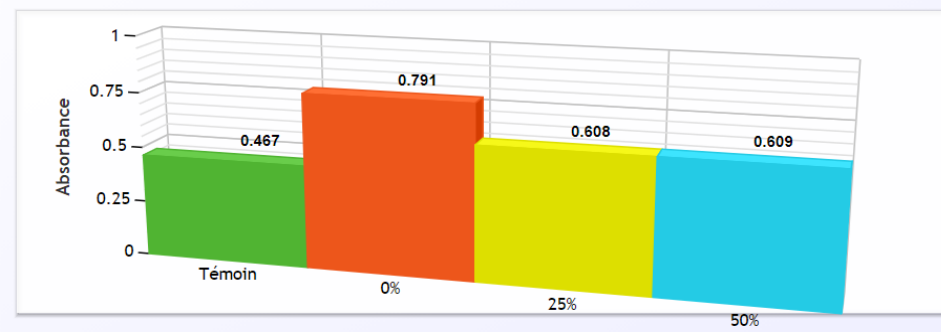
**Figure 19: Evolution de croissance de *Paenibacillus phocaensis* en milieu TSB en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 24h d'incubation**



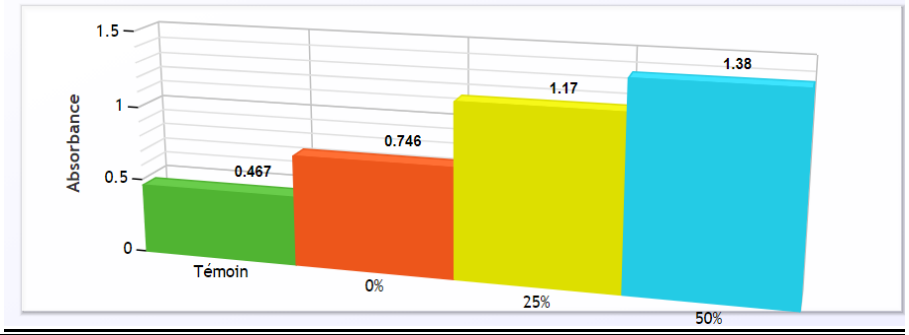

**a. AMO (-)**



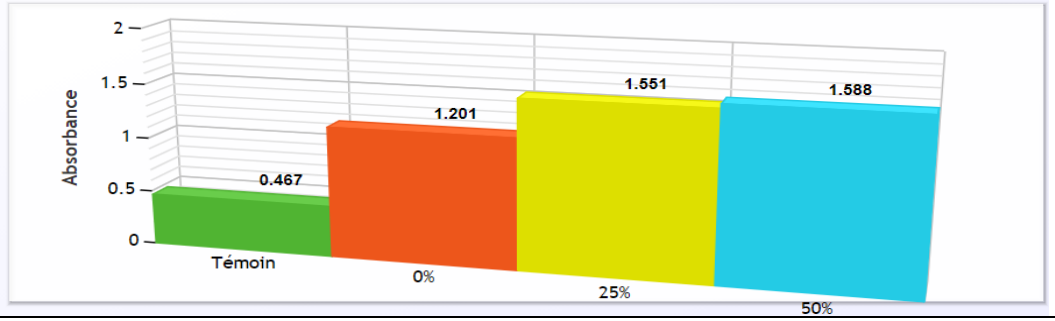

**b. AMO (+)**




**c. AMO (+) $_{120}$**




**d. AMO (+) $_{150}$**

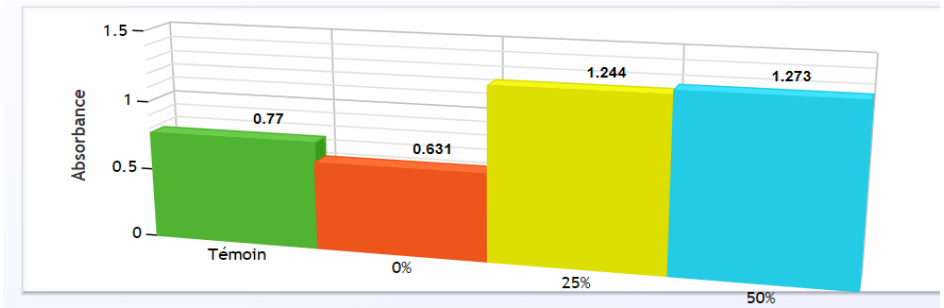



**e. AMO (+) µ-ondes**

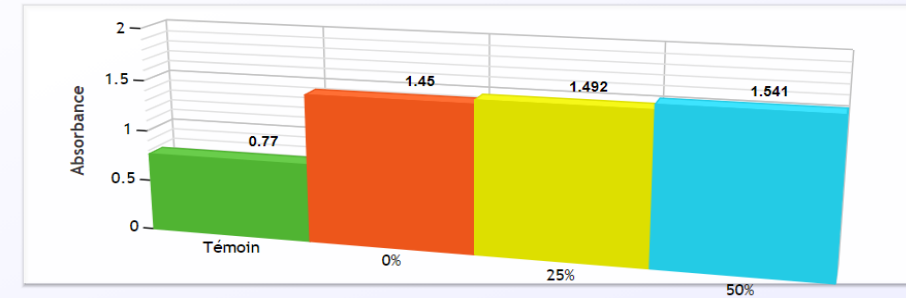
**Figure 20: Evolution de croissance d'*E. coli* en BN en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 24h d'incubation**

## 2. Résultats après 72h d'incubation

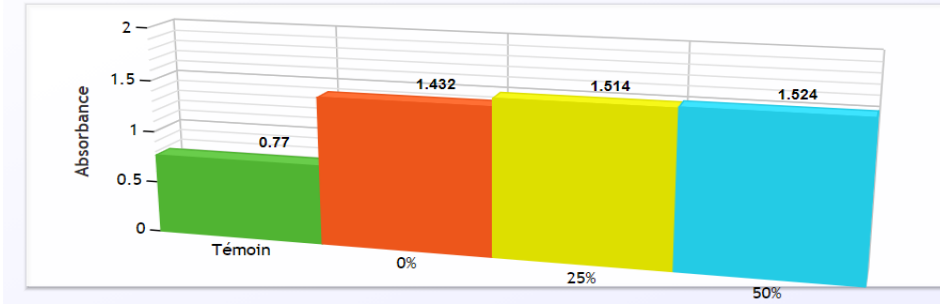
Après 72h d'incubation (Fig.21a et 22a) nous avons noté que le milieu contenant le jus de viande exempte d'antibiotique AMO (-) a montré une forte diminution de croissance pour les deux souches. Pour *Paenibacillus phocaensis*, l'absorbance s'est diminuée de 2.52 à une concentration de 50% à 1.27 pour la même concentration, soit une diminution de 50%, et le même pourcentage peut s'appliquer à ***E. coli*** (Fig.22a), avec une valeur d'absorbance de 0.88 pour la même solution et la même concentration. Cela peut avoir comme explication l'épuisement des ressources nutritive dans le milieu ou la bactérie est dans la phase de déclin dans son cycle de croissance (Michel-Briand 2007). Le même constat s'applique sur la solution AMO (+). Alors que pour les autres milieux contenant les produits de dégradation qui ont subi une cuisson, nous avons noté une augmentation de la biomasse, cela confirme l'hypothèse la nécessité d'une phase de latence pour se croitre.



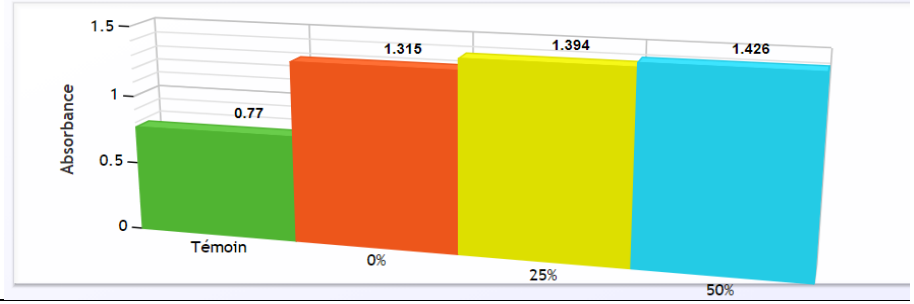

**a. AMO (-)**



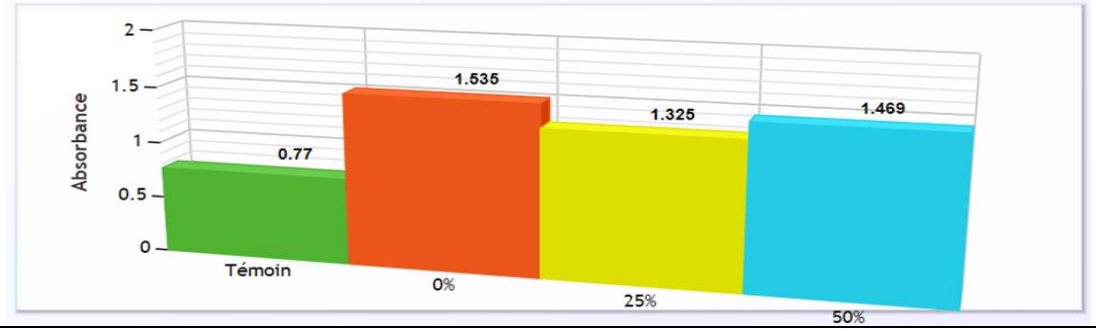

**b. AMO (+)**




**c. AMO (+) $_{120}$**

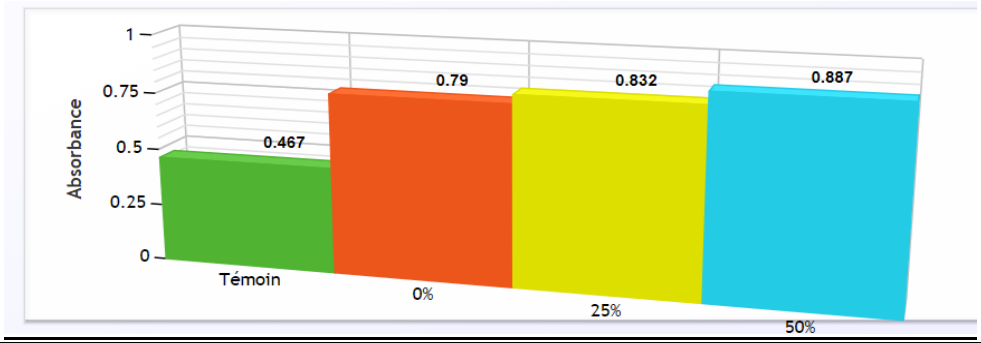



**d. AMO (+) $_{150}$**

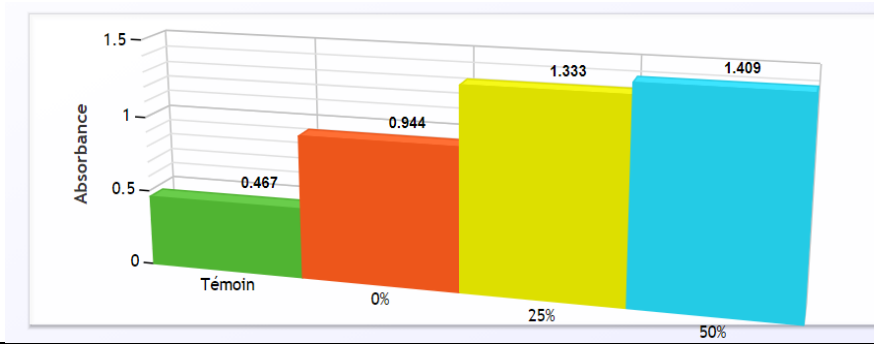



**e. AMO (+) µ-ondes**

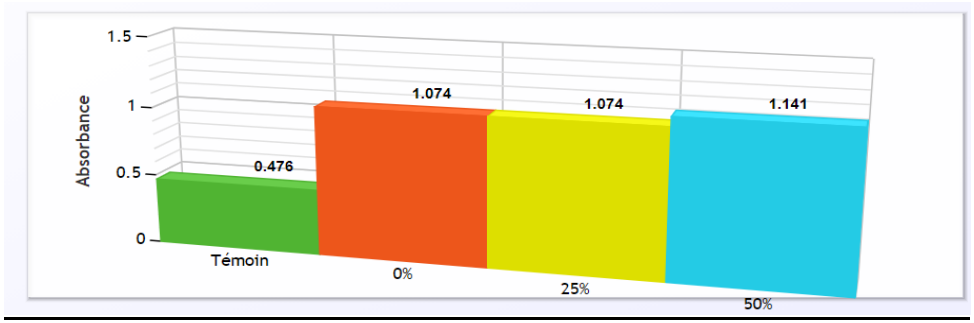
**Figure 21: Evolution de croissance de *Paenibacillus phocaensis* en milieu TSB en absence et en présence de produits de dégradation (à différente concentrations) de l'amoxicilline après 72h d'incubation**



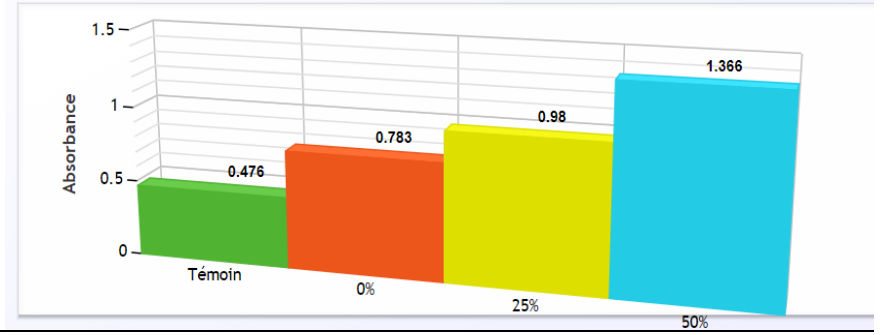

**a. AMO (-)**



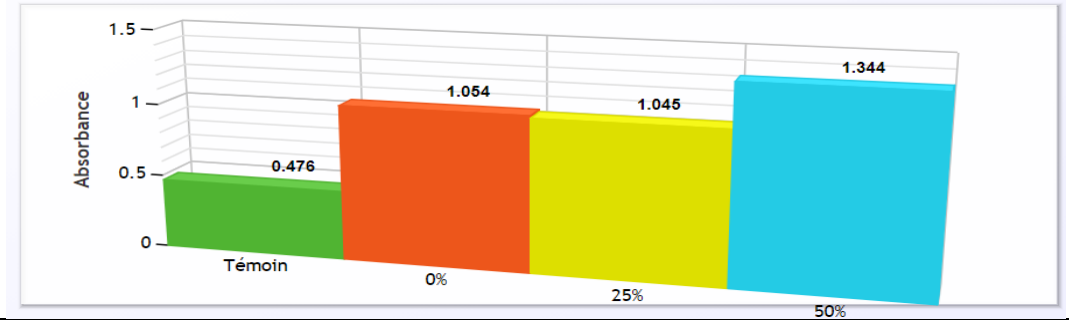

**b. AMO (+)**




**c. AMO (+) $_{120}$**




**d. AMO (+) $_{150}$**




**e. AMO (+) µ-ondes**

**Figure 22: Evolution de croissance d'*E. coli* en BN en absence et en présence de produits de dégradation (à différentes concentration) de l'amoxicilline après 72h d'incubation**

# CONCLUSION

# &

# PERSPECTIVES

Les antibiotiques sont utilisés à grande échelle par les éleveurs de volailles du monde entier pour répondre à la demande croissante de viande de poulet de chair. Les types d'antibiotiques utilisés dans le monde varient largement en raison des différentes réglementations, politiques et pratiques de surveillance par les autorités législatives. Dans certains pays, les politiques concernant l'application d'antibiotiques chez les animaux sont présentes, mais leur utilisation n'est pas contrôlée régulièrement. De nombreuses études ont montré la présence de résidus d'antibiotiques dépassant les limites maximales de résidus (LMR) dans la viande de poulet, indiquant une utilisation abusive et excessive des antibiotiques. Ces résidus peuvent provoquer des divers effets toxicologiques tels que des allergies, des mutagénicités et même des cancérogénicités. En outre des problème toxicologiques, l'utilisation d'antibiotiques pendant des périodes plus longues a tendance à réduire le nombre de bactéries sensibles, ce qui entraîne un pourcentage élevé de souches bactériennes résistantes.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à évaluer si les températures de cuissons ordinaires ont un effet dégradant sur les résidus de l'antibiotique « Amoxicilline triydraté », fréquemment utilisé en élevage de poulet, à déterminer son influence sur le rendement en chair, à étudier son inhibition lorsqu'il est chauffé à différentes températures, aussi à d'estimer la dégradation de ces résidus par deux souches bactériennes.

D'après les résultats de l'étude statistique portant sur l'influence de l'amoxicilline sur le poids des sujets, il s'est avéré que cette molécule a le potentiel de créer une différence significative dans le rendement en chair après une période d'élevage de 7 jours.

La présente étude a révélé aussi que la molécule d'amoxicilline est instable à basse température, montrant une dégradation totale, voir une transformation en sous-produits possédant des propriétés antimicrobiennes, et qui persistent en fortes quantités même après cuisson; une cuisson à 150°C pendant 25 minutes et une cuisson à 1200 W par microondes sont suffisante pour détruire seulement 28% et 34% respectivement de la quantité de résidus contenue dans le poulet traité. Ces traitements thermiques ordinaires n'ont pas le potentiel pour rendre la viande de poulet contenant une quantité de résidus importante dépassant la LMR sans danger pour la consommation humaine.

Nous avons identifié à partir de la littérature un seul produit parmi les produits de dégradation découverts, la *D-hydroxyphenylglycine,* un composé causant principalement des épisodes gastriques qui doivent être prises au sérieux dans le but d'éviter une toxicité aigüe par ce genre de substances chimiques si le poulet consommé contient des fortes concentrations de résidus d'amoxicilline.

Le chauffage de l'amoxicilline à des températures étalant de 35°C a 90°C a montré une diminution croissante de son effet inhibiteur avec un taux de réduction atteignant plus 45%, un résultat confirmant que la molécule est thermodégradable et perd son effet antimicrobien graduellement avec l'augmentation de la température.

Les souches bactérienne *E. coli* a présenté une évolution plus importante en présence des résidus d'amoxicilline que la souche *Paenibacillus phocaensis*, et c'est dû probablement à la possession d*'E. coli* à des enzymes telle que la bêta-lactamase dans plus performant face à l'action de l'amoxicilline et qui entraine une dégradation des résidus de ce derniers en produits utilisables qui aide la bactérie à se croitre.

Nos résultats représentent une mise au point pour les agents de contrôle de qualité pour évaluer la présence des antibiotiques dans la viande cuite que de la viande fraiche.

Nous avons rencontré des limitations techniques qui ont en quelque sorte empêché l'achèvement de ce travail, et ça nous a interpellé pour fixer des perspectives à réaliser dans le futur ;

- Identification des produits de dégradation d'amoxicilline non-spécifiés avec LC-MS ;
- La réalisation du même travail mais avec un échantillon plus large et avec autres molécules d'antibiotiques ;
- Réalisation des essais avec des traitements UHT;
- Evaluation de la dégradation des résidus d'antibiotiques par des bactéries résistantes et pathogènes.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Baquero, Fernando, and Javier Garau. 2010. "Prudent use of antimicrobial agents: Revisiting concepts and estimating perspectives in a global world." *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica* 28 (8): 487-488. https://academic.microsoft.com/paper/2096812796.

2. Crofts, Terence S. 2018. "Shared strategies for β-lactam catabolism in the soil microbiome." *Nature Chemical Biology* 14.

3. Fae, Shaltout. 2019. "Impacts Of Different Types Of Cooking And Freezing On Antibiotic Residues In Chicken Meat." *Food Science and Nutrition* 5 (1): 1-6. https://academic.microsoft.com/paper/3006155927.

4. Ibrahim, Adel, and William A. Moats. 1994. "Effect of Cooking Procedures on Oxytetracycline Residues in Lamb Muscle." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (11): 2561-2563. https://academic.microsoft.com/paper/1967218611.

5. Lee, M. H., H. J. Lee, and P. D. Ryu. 2001. "Public Health Risks: Chemical and Antibiotic Residues - Review -." *Asian-australasian Journal of Animal Sciences* 14 (3): 402-413. https://academic.microsoft.com/paper/2014767109.

6. Mensah, S.E.P., O.D. Koudande, P. Sanders, M. Laurentie, G.A. Mensah, and F.A. Abiola. 2014. "Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique: -EN- Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks -FR- -ES- Residuos de antibióticos y alimentos de origen animal en África: riesgos de salud pública." *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* 33 (3): 975-986. https://academic.microsoft.com/paper/2325888694.

7. Nisha, A R. 2008. "Antibiotic Residues - A Global Health Hazard." *Veterinary World* 1 (12): 375-377. https://academic.microsoft.com/paper/2070069557.

8. Rose, Martin. 1998. "The thermal stability and effect of cooking on veterinary drug residues in food." https://academic.microsoft.com/paper/2530653070.

9. Wassenaar, Trudy M. 2005. "Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Implications for Human Health." *Critical Reviews in Microbiology* 31 (3): 155-169. https://academic.microsoft.com/paper/2151910323.

10. Wright, Gerard D. 2005. «Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 10.

11. Aiello, susan E. 2016. *The merck veterinary manual.* https://academic.microsoft.com/paper/616479322.

12. Ali ferrah, es productions animales en Algérie : faible élasticité des productions classiques et émergence de l'aviculture industrielle. Mai 1988.

13. Alloui, N., and O. Bennoune. 2013. "Poultry production in Algeria: current situation and future prospects." *Worlds Poultry Science Journal* 69 (3): 613-620. https://academic.microsoft.com/paper/2123452808.

14. Bassett, Everett J., Margaret S. Keith, George J. Armelagos, Debra L. Martin, and Antonio R. Villanueva. 1980. "Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350)." *Science* 209 (4464): 1532-1534. https://academic.microsoft.com/paper/1965045382.

15. Bentley, Ronald, and J W Bennett. 2003. *What is an antibiotic? Revisited.* Vol. 52, 303-331. https://academic.microsoft.com/paper/1573857728.

16. Bergwerff, A. A., A. van Amerongen, D. Barug, and M. Lauwaars. 2005. "Rapid assays for detection of residues of veterinary drugs." 259-292. https://academic.microsoft.com/paper/188213938.

17. Brooks, George F. 2001. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology.* https://academic.microsoft.com/paper/1496293424.

18. CE, REG2C12009. 2009. *Journal officiel de l'Union européenne.*

19. Compoundchem. 2014. *A Brief Overview of Classes of Antibiotics.* Accessed 04 15, 2021. https://www.compoundchem.com/2014/09/08/antibiotics/.

20. Cotter, Pd, Stanton C, Ross Rp, and Hill C. 2012. "The impact of antibiotics on the gut microbiota as revealed by high throughput DNA sequencing." *Discovery Medicine* 13 (70): 193-199. https://academic.microsoft.com/paper/2407642165.

21. Diekema, Daniel J. 2003. "The Clinician and the Microbiology Laboratory." 113-130. https://academic.microsoft.com/paper/2491692591.

22. Engvall, E. 1971. "Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA." *Immunochemistry* 8: 871-877. https://academic.microsoft.com/paper/2774846296.

23. Erlanger, Bernard F., and Louise Goode. 1967. "Mode of Action of Penicillin." *Nature* 213 (5072): 183-184. https://academic.microsoft.com/paper/1976144868.

24. FAO. 2015. *World Agriculture: towards 2015/2030.* Rome: FAO.

25. FAO/OMS. 2018. "MAXIMUM RESIDUE LIMITS (MRLs) AND RISK MANAGEMENT RECOMMENDATIONS FOR RESIDUES OF VETERINARY DRUGS." *Codex Alimentarius.*

26. Gallagher, De Jason. 2012. *Antibiotics Simplified.* Jones & Bartlett Publishers.

27. Grashorn, M. A. 2013. "Functionality of Poultry Meat." Edited by The Journal of Applied Poultry Research.

28. Karcher, Darrin M., and Joy A. Mench. 2018. "Overview of commercial poultry production systems and their main welfare challenges." 3-25. https://academic.microsoft.com/paper/2793328588.

29. Kavanagh, Frederick. 1968. "Turbidimetric Assays: the Antibiotic Dose-Response Line." *American Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology).

30. Kırmusaoğlu, Sahra, Nesrin Gareayaghi, and Bekir S. Kocazeybek. 2019. "Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance." https://academic.microsoft.com/paper/2918823629.

31. Landers, Timothy F., Bevin Cohen, Thomas E. Wittum, and Elaine L. Larson. 2012. "A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential." *Public Health Reports* 127 (1): 4-22. https://academic.microsoft.com/paper/164134978.

32. Leekha, Surbhi, Christine L. Terrell, and Randall S. Edson. 2011. "General Principles of Antimicrobial Therapy." *Mayo Clinic Proceedings* 86 (2): 156-167. https://academic.microsoft.com/paper/1998378687.

33. Lesch, John E. 2007. "The first miracle drugs : how the sulfa drugs transformed medicine." https://academic.microsoft.com/paper/1601542428.

34. M.L., Ndiaye. 2002. *Contribution à l'étude de la contamnation microbiologique de la viande de volaille.* Dakar: Institu de technologie nucléaire appliqué ITNA, Univ. Cheikh Anta Diop .

35. Martin, Michael J., Sapna E Thottathil, and Thomas B. Newman. 2015. "Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers." *American Journal of Public Health* 105 (12): 2409-2410. https://academic.microsoft.com/paper/2157675740.

36. Meyer. 2010. *Practical High Performance Liquid Chromatography.* 5th. John & Wiley Sons.

37. NRC. 1991. "The use of drugs in food animal benefits and risks." 253-284.

38. Papich, Mark G. 2009. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* https://academic.microsoft.com/paper/2542875285.

39. Price, James F., and B.S. Schweigert. 1987. *The Science of Meat and Meat Products.* https://academic.microsoft.com/paper/1599806069.

40. Règlement (CE) N° 470. 2009. *Journal officiel de l'Union européenne.*

41. Règlement (UE) 2019/6. n.d. *Journal officiel de l'Union européenne.*

42. Smith-Howard, Kendra. 2010. "Antibiotics and agricultural change: purifying milk and protecting health in the postwar era." *Agricultural History* 84 (3): 327-351. https://academic.microsoft.com/paper/2035593705.

43. Snyder, Larry, and Wendy Champness. 1997. *Molecular genetics of bacteria.* https://academic.microsoft.com/paper/1645874374.

44. Stead, David A. 2000. "Current methodologies for the analysis of aminoglycosides." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 747 (1): 69-93. https://academic.microsoft.com/paper/2089681203.

45. Taha, Fawzi A., and Mamdouh Sharaf El-Din. 2003. "The Poultry Sector in Middle-Income Countries and Its Feed Requirements: The Case of Egypt." https://academic.microsoft.com/paper/69271668.

46. Tomley, Fiona M., and Martin W. Shirley. 2009. "Livestock infectious diseases and zoonoses." *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364 (1530): 2637-2642. https://academic.microsoft.com/paper/2116651610.

47. Tortora, Gerard J., Berdell R. Funke, and Christine L. Case. 1982. *Microbiology: An Introduction.* https://academic.microsoft.com/paper/1584096643.

48. UE, 2019. n.d. *Journal officiel de l'Union européenne.*

49. USDA. 2021. *FoodData Central.* Accessed 04 8, 2021. https://fdc.nal.usda.gov/ndb/search/list.

50. Vuillemin, P. 1889. "Antibiose et symbiose." (Association Française pour l'Avancement des Sciences) MEDECINE BOTANIQUE, SCIENCES & TECHNIQUES: 19.

51. Wang, Jian, James D MacNeil, and Jack Frank Kay. 2012. *Chemical analysis of antibiotic residues in food.* https://academic.microsoft.com/paper/1532660450.

52. Warrell, D. A., Timothy M. Cox, John D. Firth, and Estée Török. 2012. *Oxford textbook of medicine infection.* https://academic.microsoft.com/paper/2979864071.

53. Yılmaz, Çiğdem, and Gülay Özcengiz. 2017. "Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps." *Biochemical Pharmacology* 133: 43-62. https://academic.microsoft.com/paper/2535665921.

54. MOHTADJI, J. C et LAMBALLAIS (1989).Les aliments, éd, maloin, paris. P203.
55. Fenn, J.B., et al., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science, 1989. 246(4926): p. 64-71.
56. Ana Barroeta, Nutritive value of poultry meat: relationship between vitamin E and PUFA, Autonomous University of Barcelona | UAB · Department of Animal and Food Science PhD veterinarian, 2007.
57. Franca Marangoni et al. (2015), Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document, Food Nutr Res.

58. CE. 1980. *European Pharmacopoeia.* 2nd. Edited by CE. CE.

59. Christoph Pfefferle, Uwe Theobald, Hanne Gurtler, Hans-Peter Fiedler. 2000. "Improved secondary metabolite production in the genus Streptosporangium by optimization of the fermentation conditions." *Journal of Biotechnology* 135-142.

60. H.L.Jørgensen, E.Schulz. 1985. "Turbidimetric measurement as a rapid method for the determination of the bacteriological quality of minced meat." *International Journal of Food Microbiology* 2 (3): 177-183.

61. Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. 1999. *Microbiologie Médicale.* Paris: Librairie Maloine.

62. Meyer. 2010. *Practical High Performance Liquid Chromatography.* 5th. John & Wiley Sons.

63. Morgenthaler, Stephan. 2007. *Introduction à la statistique.* 3e. Edited by Lausanne. PPUR presses polytechniques.

64. Mustika Furi, Morin, Siti Sinaga, Putra, Effendy De Lux. 2018. "Analysis of Amoxicillin and Tetracycline Residues in Chicken Meat Using High Performance Liquid-Mass Spectrometry." *Indonesian Journal Of Pharmaceutilcal and Clinical Research.*

65. NCBI. 2021. *Oxfenicine.* 05 23. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxfenicine.

66. Patrick, Butaye, Freddy, and Haesebrouck. 2003. "Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed." *Clin Microbiol Rev.* 175-188.

67. PubChemNCBI. n.d. *Amoxicillin.* https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin.

68. Ramos, Fernando, Joe Boison, and Lynn G Friedlander. 2012. *Amoxicillin.* FAO, FAO.

69. USP. 2017. *US Pharmacopeia 41-NF36.* United States Pharmacopeial Convention.

70. W.J. Lough, I.W. Wainer. 1995. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice.* Blackie Acamdemic & Professional.

71. Bhargav, B., Sachin D. Shastri, and S.P. Poornav. 2016. "Measurement of the Zone of Inhibition of an Antibiotic." *International Conference on Advanced Computing (IACC).* Bhimavaram, India: IEEE.

72. DibnerJ.J., and J.D Rcihards. 2005. "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action." *Poultry Science* 634-643.

73. Houssam Eddine Slama (2015), Recherche des résidus d'antibtiotiques dans le poulet frais et cuit et étude de la cinétique de la molécule, mémoire de fin d'étude, université BLIDA 1.

74. FAO/OMS. 2018. "MAXIMUM RESIDUE LIMITS (MRLs) AND RISK MANAGEMENT RECOMMENDATIONS FOR RESIDUES OF VETERINARY DRUGS." *Codex Alimentarius.*

75. Michel-Briand, Yvon. 2007. "Resistance to the latest beta-lactams: mechanisms of acquisition and spread of resistance in Enterobacteriaceae." *Bull Acad Natl Med* 35-50.

76. MOATS, W. A. 1988. "Inactivation of Antibiotics by Heating in Foods and Other Substrates - A Review-." *Journal of Food Protection* 491-497.

77. Morgenthaler, Stephan. 2007. *Introduction à la statistique.* 3e. Edited by Lausanne. PPUR presses polytechniques.

78. Mustika Furi, Morin, Siti Sinaga, Putra, Effendy De Lux. 2018. "Analysis of Amoxicillin and Tetracycline Residues in Chicken Meat Using High Performance Liquid-Mass Spectrometry." *Indonesian Journal Of Pharmaceutilcal and Clinical Research.*

79. NCBI. 2021. *Oxfenicine.* 05 23. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxfenicine.

80. Patrick, Butaye, Freddy, and Haesebrouck. 2003. "Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed." *Clin Microbiol Rev.* 175-188.

81. Walter, H. Traub, and Leonhard Birgit. 1995. "Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 149-154.

82. Y., HAN, and PARSONS C.M. 1987. "Nutritive Value of High Oil Corn for Poultry." *Poultry Science* 103-111.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Appareillages et verreries utilisés au cours de l'expérimentation

| Appareillages | Verreries | Autres matériels |
|---|---|---|
| VORTEX | Tubes à essai stériles | Anse de platine. |
| Balance analytique | Pipettes jaugées stériles | Bec benzène. |
| Spectrophotomètre | Fioles stériles | Boites de pétri. |
| Incubateur avec agitation | Ampoule à décanter | Gants jetables. |
| Centrifugeuse | | Micro pipette. |
| HPLC Perkin Elmer S200 | | Microplaque de titration. |
| Pied à coulisse | | Papier aluminium. |
| Bain marie | | Portoir pour tube. |
| | | Spatule. |
| | | Seringues et filtre seringue 0.45 µm |
| | | Colonne analytique Phenomenex® $C_{18}$ (25 cm x 4mm) 5µm. |
| | | Écouvillons stériles |
| | | Disques de papier |
| | | Incubateur a agitation |

## Annexe 2 : Composition des solutions utilisées

**Tampon pH5**

L'eau distillée …….....1000 ml

$KH_2PO_4$..... 6.8 g

KOH …… .45%

## Annexe 3 : Composition des milieux de culture utilisés

**TSB**

Extrait pancréatique de la caséine……0.17g

Digestion papaique de Farine de soja.....…….....0.3g

NaCl…….....0.5g

K2HPO4…….....0.25g

Glucose Monohydrate…….....0.25g

**TSA 1/10**

TSB……...3g

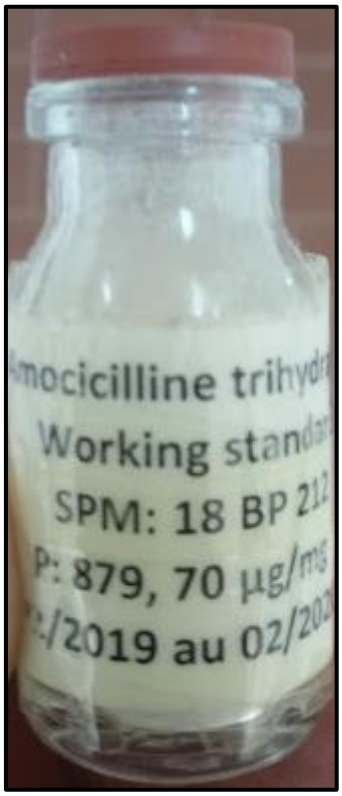
Agar ……15g

## Annexe 4 : Table des valeurs critiques de test t-student

# t-test table

| cum. prob | $t_{.50}$ | $t_{.75}$ | $t_{.80}$ | $t_{.85}$ | $t_{.90}$ | $t_{.95}$ | $t_{.975}$ | $t_{.99}$ | $t_{.995}$ | $t_{.999}$ | $t_{.9995}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **one-tail** | **0.50** | **0.25** | **0.20** | **0.15** | **0.10** | **0.05** | **0.025** | **0.01** | **0.005** | **0.001** | **0.0005** |
| **two-tails** | **1.00** | **0.50** | **0.40** | **0.30** | **0.20** | **0.10** | **0.05** | **0.02** | **0.01** | **0.002** | **0.001** |
| **df** | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.000 | 1.000 | 1.376 | 1.963 | 3.078 | 6.314 | 12.71 | 31.82 | 63.66 | 318.31 | 636.62 |
| 2 | 0.000 | 0.816 | 1.061 | 1.386 | 1.886 | 2.920 | 4.303 | 6.965 | 9.925 | 22.327 | 31.599 |
| 3 | 0.000 | 0.765 | 0.978 | 1.250 | 1.638 | 2.353 | 3.182 | 4.541 | 5.841 | 10.215 | 12.924 |
| 4 | 0.000 | 0.741 | 0.941 | 1.190 | 1.533 | 2.132 | 2.776 | 3.747 | 4.604 | 7.173 | 8.610 |
| 5 | 0.000 | 0.727 | 0.920 | 1.156 | 1.476 | 2.015 | 2.571 | 3.365 | 4.032 | 5.893 | 6.869 |
| 6 | 0.000 | 0.718 | 0.906 | 1.134 | 1.440 | 1.943 | 2.447 | 3.143 | 3.707 | 5.208 | 5.959 |
| 7 | 0.000 | 0.711 | 0.896 | 1.119 | 1.415 | 1.895 | 2.365 | 2.998 | 3.499 | 4.785 | 5.408 |
| 8 | 0.000 | 0.706 | 0.889 | 1.108 | 1.397 | 1.860 | 2.306 | 2.896 | 3.355 | 4.501 | 5.041 |
| 9 | 0.000 | 0.703 | 0.883 | 1.100 | 1.383 | 1.833 | 2.262 | 2.821 | 3.250 | 4.297 | 4.781 |
| 10 | 0.000 | 0.700 | 0.879 | 1.093 | 1.372 | 1.812 | 2.228 | 2.764 | 3.169 | 4.144 | 4.587 |
| 11 | 0.000 | 0.697 | 0.876 | 1.088 | 1.363 | 1.796 | 2.201 | 2.718 | 3.106 | 4.025 | 4.437 |
| 12 | 0.000 | 0.695 | 0.873 | 1.083 | 1.356 | 1.782 | 2.179 | 2.681 | 3.055 | 3.930 | 4.318 |
| 13 | 0.000 | 0.694 | 0.870 | 1.079 | 1.350 | 1.771 | 2.160 | 2.650 | 3.012 | 3.852 | 4.221 |
| 14 | 0.000 | 0.692 | 0.868 | 1.076 | 1.345 | 1.761 | 2.145 | 2.624 | 2.977 | 3.787 | 4.140 |
| 15 | 0.000 | 0.691 | 0.866 | 1.074 | 1.341 | 1.753 | 2.131 | 2.602 | 2.947 | 3.733 | 4.073 |
| 16 | 0.000 | 0.690 | 0.865 | 1.071 | 1.337 | 1.746 | 2.120 | 2.583 | 2.921 | 3.686 | 4.015 |
| 17 | 0.000 | 0.689 | 0.863 | 1.069 | 1.333 | 1.740 | 2.110 | 2.567 | 2.898 | 3.646 | 3.965 |
| 18 | 0.000 | 0.688 | 0.862 | 1.067 | 1.330 | 1.734 | 2.101 | 2.552 | 2.878 | 3.610 | 3.922 |
| 19 | 0.000 | 0.688 | 0.861 | 1.066 | 1.328 | 1.729 | 2.093 | 2.539 | 2.861 | 3.579 | 3.883 |
| 20 | 0.000 | 0.687 | 0.860 | 1.064 | 1.325 | 1.725 | 2.086 | 2.528 | 2.845 | 3.552 | 3.850 |
| 21 | 0.000 | 0.686 | 0.859 | 1.063 | 1.323 | 1.721 | 2.080 | 2.518 | 2.831 | 3.527 | 3.819 |
| 22 | 0.000 | 0.686 | 0.858 | 1.061 | 1.321 | 1.717 | 2.074 | 2.508 | 2.819 | 3.505 | 3.792 |
| 23 | 0.000 | 0.685 | 0.858 | 1.060 | 1.319 | 1.714 | 2.069 | 2.500 | 2.807 | 3.485 | 3.768 |
| 24 | 0.000 | 0.685 | 0.857 | 1.059 | 1.318 | 1.711 | 2.064 | 2.492 | 2.797 | 3.467 | 3.745 |
| 25 | 0.000 | 0.684 | 0.856 | 1.058 | 1.316 | 1.708 | 2.060 | 2.485 | 2.787 | 3.450 | 3.725 |
| 26 | 0.000 | 0.684 | 0.856 | 1.058 | 1.315 | 1.706 | 2.056 | 2.479 | 2.779 | 3.435 | 3.707 |
| 27 | 0.000 | 0.684 | 0.855 | 1.057 | 1.314 | 1.703 | 2.052 | 2.473 | 2.771 | 3.421 | 3.690 |
| 28 | 0.000 | 0.683 | 0.855 | 1.056 | 1.313 | 1.701 | 2.048 | 2.467 | 2.763 | 3.408 | 3.674 |
| 29 | 0.000 | 0.683 | 0.854 | 1.055 | 1.311 | 1.699 | 2.045 | 2.462 | 2.756 | 3.396 | 3.659 |
| 30 | 0.000 | 0.683 | 0.854 | 1.055 | 1.310 | 1.697 | 2.042 | 2.457 | 2.750 | 3.385 | 3.646 |
| 40 | 0.000 | 0.681 | 0.851 | 1.050 | 1.303 | 1.684 | 2.021 | 2.423 | 2.704 | 3.307 | 3.551 |
| 60 | 0.000 | 0.679 | 0.848 | 1.045 | 1.296 | 1.671 | 2.000 | 2.390 | 2.660 | 3.232 | 3.460 |
| 80 | 0.000 | 0.678 | 0.846 | 1.043 | 1.292 | 1.664 | 1.990 | 2.374 | 2.639 | 3.195 | 3.416 |
| 100 | 0.000 | 0.677 | 0.845 | 1.042 | 1.290 | 1.660 | 1.984 | 2.364 | 2.626 | 3.174 | 3.390 |
| 1000 | 0.000 | 0.675 | 0.842 | 1.037 | 1.282 | 1.646 | 1.962 | 2.330 | 2.581 | 3.098 | 3.300 |
| **z** | 0.000 | 0.674 | 0.842 | 1.036 | 1.282 | 1.645 | 1.960 | 2.326 | 2.576 | 3.090 | 3.291 |
| | 0% | 50% | 60% | 70% | 80% | 90% | 95% | 98% | 99% | 99.8% | 99.9% |
| | **Confidence Level** | | | | | | | | | | |

## Annexe 5 : Amoxicilline $3H_2O$ standard



# Annexe 6 : Temps de rétention relatifs aux produits de dégradation de l'amoxicilline (extrait de monographe d'amoxicilline) (USP, 2017)

| Name | Relative Retention Time |
|---|---|
| Amoxicillin related compound I[a] (D-hydroxyphenylglycine) | 0.32 |
| Amoxicillin related compound D[b,c] (amoxicillin open ring) | 0.53 |
| | 0.68 |
| Amoxicillin related compound A[d] (6-aminopenicillanic acid) | 0.78 |
| Amoxicillin related compound B[e,f] (L-amoxicillin) | 0.87 |
| Amoxicillin | 1.0 |
| Amoxicillin related compound G[g] (D-hydroxyphenyl-glycylamoxicillin) | 2.9 |
| Amoxicillin related compound E[h,i] (amoxicillin penilloic derivative) | 4.5 |
| Amoxicillin related compound M[j] (*N*-(penicillan-6-yl) open ring amoxicillinamide) | 6.0 |
| Amoxicillin related compound F[e,k] (phenylpyrazinediol) | 6.3 |
| Amoxicillin related compound C[l] (amoxicillin rearrangement prod-uct) | 6.4 |
| Amoxicillin related compound E[h,i] (amoxicillin penilloic derivative) | 6.7 |
| Amoxicillin related compound J[m] (amoxicillin open ring dimer) | 8.8 |
| Amoxicillin related compound L[n] (*N*-(penicillan-6-yl) amoxicil-linamide) | 9.0 |
| Any unspecified individual impurity | — |

## Annexe 7 : Appareil HPLC (Perkin Elmer S200)



## Annexe 8 : Incubateur à agitation

