

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid
Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de
la Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن
باديس مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle CHAOUCH Chahrazed

Mlle SEDDIK Nour elhouda

Pour obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité : BIOTECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

THÈME

Détection des résidus d'antibiotique dans une série des tissus de poissons d'aquaculture par une validation des différentes méthodes de dépistages.

DEVENT LE JURY

<i>Président</i>	<i>M. AIT SAADA Djamel</i>	<i>M.C.A</i>	<i>U Mostaganem</i>
<i>Encadreur</i>	<i>M. KAABES Nour eddine</i>	<i>Enseignant associé</i>	<i>U Mostaganem</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Mme.AIT CHABANE Ouiza</i>	<i>M.C.B</i>	<i>U Mostaganem</i>

Année universitaire : 2019-2020

REMERCIEMENTS

Louange à notre seigneur « ALLAH » qui nous a dotés de la merveilleuse faculté de raisonnement. Louange à notre créateur qui nous a permis d'acquérir le savoir. C'est à lui que nous adressons toute notre gratitude en premier lieu.

On adresse nos remerciements les plus sincères à notre promoteur ***M. KAABES Nour eddine*** pour l'orientation et les conseils.

Nous tenons à remercier les honorables membres de jury qui ont acceptés de juger ce travail.

Nous souhaitons adresser nos remerciements à ***M. AIT SAADA Djamel*** pour l'honneur qu'il nous faisons en acceptant de présider ce jury.

Nous remercions également ***Mme.AIT CHABANE Ouiza*** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A l'être le plus cher du monde ma grande mère qui est pour un exemple de courage. De sagesse et de sens du devoir. Les mots sont bien trop faibles pour lui exprimer toutes ma reconnaissance. Que dieu la garde et la protège.

Au pur esprit de mon âme Abdelkader pour son soutien moral et pour leur courage. En lui souhaitant une vie pleine de joie et de santé.

A ma belle mère.

A ma chère cousine : Sanaa.

CHAOUCH Chahrazed

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A mon très cher frère qui ma toujours soutenu, que dieu lui préserve et protège.

A ma chère belle sœur et mon neveu

A toute ma famille et mes amis

SEDDIK Nour elhouda

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction générale.....1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur l'aquaculture

I.1. Historique de l'aquaculture.....3

I.2. Définition de l'aquaculture.....3

I.3. Les différents types d'aquaculture.....4

I.4. Objectifs de l'aquaculture.....4

I.5. Impact environnemental.....5

I.6. Aperçu sur l'aquaculture mondiale.....5

I.6.1. Situation mondiale de l'aquaculture.....5

I.6.2. Comparaison de l'évolution de l'aquaculture et de la pêche.....6

I.6.3. Production aquacole mondiale.....7

I.6.4. Évolution de la production aquacole mondiale par groupes d'espèces.....9

I.7. L'aquaculture méditerranéenne.....10

I.7.1. Evolution de la production.....	10
I.7.2. Evolution de la production aquacole des différents pays.....	10
I.7.3. Evolution de la production des principales espèces.....	11
I.8. L’Aquaculture en Algérie.....	12
I.9. Généralité sur les poissons.....	15
I.9.1. Typologie des poissons en fonction de la température et l’oxygène.....	15
I.9.2. Température.....	16
I.9.3. Oxygène.....	16
I.9.4. Typologie des poissons en fonction de la salinité du milieu.....	16
I.9.5. Chair des poissons.....	17
I.9.6. Structure.....	17
I.9.7. Composition chimique.....	17
I.9.7.a. Composés lipidiques.....	18
I.9.7.b. Composés protéiques.....	19
I.9.7.c. Glucides.....	20
I.9.7.d. Fraction azotée non protéique.....	20
I.9.7.e. Vitamines et sels minéraux.....	20
I.9.8. Fabrication des aliments destinés aux poissons.....	20
Chapitre II : Généralités sur les antibiotiques	
II.1. Historique.....	22
II.2. Définition d’un antibiotique.....	22
II.3. Mode d’action des antibiotiques.....	22
II.4. Pharmacocinetique des antibiotiques.....	23

II.5. Classification des antibiotiques.....	23
II.6. Usage des antibiotiques en médecine vétérinaire.....	25
II.7. Conséquences négatives d'utilisation des antibiotiques chez les animaux.....	25
II.8. Les résidus d'antibiotiques.....	26
II.8.1. Définition des résidus.....	26
II.8.2. Facteurs de persistance des résidus.....	26
II.8.3. Les risques présentés par les résidus.....	26
II.8.3.1. Risques pour la santé publique.....	26
II.8.3.1.a. toxicité directe.....	26
II.8.3.1.b. les réactions allergiques.....	27
II.8.3.1.c. L'antibiorésistance.....	27
II.8.3.1.c.1. Mécanisme d'acquisition de l'antibioresistance.....	27
II.8.3.1.c.2. Mécanisme de résistance.....	28
II.8.3.1.d. les autres risques pour l'homme.....	28
II.8.3.2. Risques pour la santé animale.....	29
II.8.3.3. Risques d'ordre technologique.....	29
II.8.3.4. Risques pour l'environnement.....	29
II.8.4. Délai d'attente.....	30
II.8.4.1. Définition.....	30
II.8.4.2. Fixation du temps d'attente.....	30
II.8.4.3. Modalité de détermination du temps d'attente.....	30
II.8.5. LMR des antibiotiques.....	31
II.8.5.1. Définition.....	31

II.8.5.2. Fixation de la LMR.....	31
II.8.6. Les résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques.....	31

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Article 01.....	34
III.1.1. Site d'étude.....	34
III.1.2. Enquête par questionnaire et collecte d'échantillons.....	35
III.1.3. Dépistage des résidus d'antimicrobiens.....	35
III.1.4. Préparation de la courbe standard.....	36
III.1.5. Préparation de l'échantillon.....	36
III.1.6. Analyse HPLC des résidus d'oxytétracycline.....	37
III.1.7. Expérience de récupération.....	37
III.2. Article 02.....	37
III.2.1. Préparation et extraction des échantillons.....	39
III.2.2. Extraction et concentration en phase solide.....	39
III.2.3. Dérivatisation et extraction.....	40
III.2.4. Dérivatisation des solutions étalons.....	40
III.2.5. Analyse CL et quantification.....	40
III.2.6. Récupération à partir d'échantillons dopés.....	41
III.2.7. Identification des dérivés fluorescents.....	41
III.3. Article 03.....	42
III.3.1. Préparation du matériel de référence et du stock standard solutions.....	43
III.3.2. Échantillons de poissons sélectionnés pour l'étude.....	43
III.3.3. Préparation des échantillons.....	44

III.3.4. Préparation des échantillons de contrôle.....	44
III.3.5. Extraction de médicaments à partir des matières premières du poisson.....	44
III.3.6. Détermination des tétracyclines dans les échantillons de poissons.....	45
III.3.7. Détermination des macrolides dans les échantillons de poissons.....	45
III.3.8. Détermination des sulfamides dans les échantillons de poissons.....	46
III.3.9. Détermination de l'aminoglycoside-streptomycine dans le poisson échantillons.....	46
III.3.10. Détermination des β -lactames dans les échantillons de poissons.....	47
Chapitre IV : Résultats et Discussion	
IV.1. Article 01.....	48
IV.1.1. Caractéristiques et fonctionnement des éleveurs de poissons-chats.....	48
IV.1.2. Utilisation de médicaments dans la production aquacole.....	48
IV.1.3. Courbe standard de l'oxytétracycline et résultats de la récupération.....	48
IV.1.4. Prévalence des résidus d'antibiotiques dans les poissons.....	50
IV.2. Article 02.....	53
IV.2.1. Extraction et déprotéinisation.....	58
IV.2.2. Formation d'un dérivé fluorescent.....	59
IV.2.3. Séparation et détection de CL.....	60
IV.2.4. Identification du dérivé de l'amoxicilline.....	62
IV.3. Article 03.....	63
IV.3.1. Comptage par minute pour les échantillons blancs.....	64
IV.3.2. Évaluation des points de contrôle pour les différents médicaments résidus.....	65
Conclusion.....	67

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 01: Part respective de l'aquaculture et de la pêche dans la consommation de poisson (FAO, 2018).....	6
Figure 02 : Production halieutique et aquacole mondiale (FAO, 2018).....	7
Figure 03 : Production mondiale de poisson d'élevage destiné à la consommation et de plantes aquatiques cultivées (FAO, 2018).....	8
Figure 04: Taux de croissance annuel moyen de la production aquacole (hors plantes aquatiques) (FAO, 2018).....	9
Figure 05 : Evolution de la production aquacole mondiale par groupes d'espèces (FAO, 2008).....	9
Figure 06 : Production aquacole des principaux pays producteurs en méditerranée (FAO, 2009).....	10
Figure 07 : Quantités produites en pourcentage de la production totale (Eurostat, 2006).....	11
Figure 08 : Principales espèces aquacoles produites dans les pays de l'Union Européenne...11	
Figure 09 : Production européenne du Bar et de la Dorade (FAO, 2009 - données 2007).....	12
Figure 10 : Production de l'aquaculture reportée en Algérie (depuis 1950) (Statistiques de pêche de la FAO, 2006).....	14
Figure 11: principaux sites d'action des ATB (Mevius et al, 1999;Oxoby, 2002;Puyt et Guérin-Faubleé, 2006; Errecalde, 2007).....	23
Figure 12: Mécanisme d'action d'antibioresistance (Teale, 2002).....	28
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la solution étalon d'oxytétracycline (Olufemi et Basiru, 2013).....	36
Figure 14 : Chromatogramme du résidu d'oxytétracycline dans un échantillon de foie de poisson-chat (Olufemi et Basiru, 2013).....	49
Figure 15 : Effet de la température de réaction sur la formation du produit fluorescent à partir de 50 ng/ml d'amoxicilline en 30 min (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	53

Figure 16 : Effet du temps de réaction sur la formation de produit fluorescent à partir de 50ng/ml d'amoxicilline à 100°C (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	54
Figure 17 : Effet de la concentration de formaldéhyde dans une solution tampon d'acide citrique sur la formation d'un produit fluorescent à partir de 50 ng/ml d'amoxicilline (réaction à 100°C pendant 30 min) (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	54
Figure 18 : Effet de la concentration d'acide trichloroacétique sur la formation d'un produit fluorescent à partir de 50 ng/ml d'amoxicilline (réaction à 100°C pendant 30 min) (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	55
Figure 19 : Chromatogrammes de (A) solution standard d'amoxicilline, 2,5ng/injection, (B) contrôle du tissu musculaire du poisson-chat, et (C) tissu musculaire du poisson-chat dopé à l'amoxicilline à 5 ng/g (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	55
Figure 20 : Chromatogrammes de (A) tissu musculaire de contrôle de saumon et (B) tissu musculaire de saumon dopé à l'amoxicilline à 5 ng/g (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	56
Figure 21 : Structures de (A) l'amoxicilline et (B) son principal dérivé, la 2-hydroxy-3-phénol-6-méthylpyrazine (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	56

Liste des tableaux

Tableau 01 : Historique des fermes aquacoles en Algérie (Karali et Echikh ,2004).....	13
Tableau 02 : Composition des filets de diverses espèces de poissons d'eau douce (Murray et Burt, 1969 ; Poulter et Nicolaidis, 1985a ; Poulter et Nicolaidis, 1985b).....	18
Tableau 03 : Pourcentage d'acides aminés essentiels de différentes protéines (Braekkan, 1976 ; Moustgard, 1957).....	19
Tableau 04 : les grandes familles d'anti infectieux (Talbert et al, 2009).....	24
Tableau 05 : valeurs moyennes de récupération à différents niveaux d'oxytétracycline (Olufemi et Basiru, 2013).....	50
Tableau 06 : Résidus d'antimicrobiens et d'oxytétracycline dans les restaurants et les fermes aquacoles à Ibadan (Olufemi et Basiru, 2013).....	51
Tableau 07 : Récupération d'amoxicilline dans les échantillons de tissu musculaire de poisson-chat dopé (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	56
Tableau 08 : Récupération d'amoxicilline dans les échantillons de tissu musculaire de saumon dopé (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	57
Tableau 09 : Données chromatographiques, spectrométriques de masse et spectroscopiques 1 H-NMR du dérivé fluorescent de l'amoxicilline (2-hydroxy-3-phénol-6-méthylpyrazine) (Ang <i>et al.</i> , 1996).....	58
Tableau 10 : Comptages à blanc par minute pour les différentes espèces de poissons obtenus par la technique Charm II (Mukota <i>et al.</i> , 2020).....	63
Tableau 11 : Points de contrôle pour les différents antimicrobiens dans les échantillons de poissons blancs (Mukota <i>et al.</i> , 2020).....	64

Liste des abréviations :

% : pourcentage.

°C : degré Celsius.

µg : microgramme.

µg/kg : microgramme par kilogramme.

µm : micromètre.

A : ampère.

ANOVA : Analyse unidirectionnelle de la variance.

ARF : antibiotique régulateur de flore

ATB : antibiotique

CCVRDF : Comité du Codex Alimentarius sur les résidus de Médicaments Vétérinaire dans les Aliments

CEE : communauté économique européenne.

Cl : chromatographie liquide.

Cm : centimètre.

cm² : centimètre carré.

cm³ : centimètre cube.

CMI : concentration minimale inhibitrice

CP : point de contrôle.

Cpm : points de contrôle par minute.

CV : coefficients de variation

DEP : sonde d'exposition directe.

DES : dose sans effets.

DJA : dose journalière.

ETR : l'écart-type relatif.

FAO : Food Agriculture Organisation.

fig : figure.

g : gramme.

Hg : hectogrammes.

HPLC : chromatographie liquide haute performance.

Hz : hertz.

L : litre.

Lip : lipides.

LMR : Limite maximale de résidus.

LOD : limite de détection.

LOQ : limite de quantification.

M : mmol /ml.

MA : milliampère.

MBR : réponse moyenne du blanc.

mg : milligramme.

MHz : mégahertz.

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

Moy : moyenne.

MT : Million de Tonne.

MT/an : Million de Tonne par an.

ng : nanogramme.

nm : nanomètre.

pH : potentiel d'hydrogène.

ppm : partie par million.

Pro : protéines.

R² : coefficient de corrélation

RMN : résonance magnétique nucléaire.

rpm : rotation per minute.

S : seconde.

SD : écart type.

T : Tonne.

TCA : acide trichloroacétique.

tr : tour.

USD : Dollars.

µl : microlitre.

Résumé

La pratique de l'utilisation des antibiotiques dans la production des poissons et la présence des résidus d'antibiotique ont été étudiées par plusieurs chercheurs.

On a choisi trois articles scientifiques dont le but d'étudier la présence de ces derniers dans les poissons d'élevage.

Le premier article est présenté sous le titre d'utilisation d'antibiotiques et résidus d'oxytétracycline chez le poisson-chat africain (Nigeria). Les résultats ont montré que la majorité des répondants (95%) ont fréquemment administré des médicaments (dans l'eau et les aliments) à leurs poissons sans ordonnance vétérinaire et sans respecter le délai d'attente. La Commission a établi une limite maximale de résidus de 600 et 200 µg/kg respectivement. Cela impliquait qu'une quantité appréciable de poisson, présentait des risques liés aux résidus d'antibiotiques et à la sécurité alimentaire.

Le deuxième article montre une détermination de l'amoxicilline dans les tissus de poisson-chat et de saumon par chromatographie liquide avec dérivatisation précolonne de formaldéhyde. Les récupérations moyennes d'amoxicilline dopée à 2,5-20 ppb étaient >80 % pour le poisson-chat et >75 % pour le tissu musculaire de saumon, avec des coefficients de variation de <6 %. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les tissus de poisson-chat le tissu musculaire de saumon étaient respectivement de 0,5 à 1,2 ppb et de 0,8 et 2,0 ppb.

Le troisième article étudie la validation primaire des tests Charm II pour la détection des résidus d'antimicrobiens dans une série de poissons d'aquaculture. Les résultats de cette étude démontrent l'adéquation de la technique Charm II comme outil de dépistage rapide pour la détection des résidus d'antimicrobiens dans une variété d'espèces de poissons aux limites maximales de résidus (LMR) établies dans les lignes directrices de l'UE.

Mots-clés : Aquaculture des poissons d'élevage, antibiotiques, résidus d'antibiotique, Maximum limite de résidus, Dépistage.

Abstract

The practice of antibiotic use in fish production and the presence of antibiotic residues have been studied by several researchers.

Three scientific articles were selected to study the presence of these in farmed fish.

The first article is presented under the title of antibiotic use and oxytetracycline residues in African catfish (Nigeria). The results showed that the majority of respondents (95%) frequently administered drugs (in water and feed) to their fish without veterinary prescription and without respecting the withdrawal period. The Commission established a maximum residue limit of 600 and 200 µg/kg respectively. This implied that a significant amount of fish presented risks related to antibiotic residues and food safety.

The second article shows a determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with pre-column derivatization of formaldehyde. Mean recoveries of amoxicillin spiked at 2.5-20 ppb were >80% for catfish and >75% for salmon muscle tissue, with coefficients of variation of <6%. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for catfish tissue and salmon muscle tissue were 0.5-1.2 ppb and 0.8-2.0 ppb respectively.

The third article investigates the primary validation of Charm II tests for the detection of antimicrobial residues in a series of aquaculture fish. The results of this study demonstrate the suitability of the Charm II technique as a rapid screening tool for the detection of antimicrobial residues in a variety of fish species at maximum residue limits (MRLs) set in EU guidelines.

Keywords: Farmed fish aquaculture, antibiotics, antibiotic residues, Maximum Residue Limit, Screening.

ملخص

تمت دراسة ممارسة استخدام المضادات الحيوية في إنتاج الأسماك ووجود بقايا المضادات الحيوية من قبل العديد من الباحثين.

تم اختيار ثلاث مقالات علمية لدراسة وجودها في الأسماك المستزرعة. يتم تقديم المقالة الأولى تحت عنوان استخدام المضادات الحيوية ومخلفات أوكسي تتراسيكلين في سمك السلور الأفريقي (نيجيريا). وأظهرت النتائج أن غالبية المستجيبين (95%) تناولوا الأدوية بشكل متكرر (في الماء والأعلاف) لأسماكهم دون وصفة بيطرية ودون تلبية فترة الانسحاب. حددت اللجنة حدًا أقصى للمخلفات يبلغ 600 و 200 ميكروغرام / كغ على التوالي. وهذا يعني أن كمية كبيرة من الأسماك تشكل مخاطر تتعلق بمخلفات المضادات الحيوية وسلامة الأغذية.

توضح المقالة الثانية تحديد الأموكسيسيلين في أنسجة سمك السلور والسلمون بواسطة كروماتوجرافيا سائلة مع اشتقاق ما قبل العمود للفورمالديهايد. كان متوسط الاسترداد 2.5-20 جزء في البليون من أموكسيسيلين المسنن < 80% لسمك السلور و < 75% لأنسجة عضلات السلمون ، مع معاملات تباين أقل من 6%. كانت حدود الكشف (LOD) والقياس الكمي (LOQ) لأنسجة سمك السلور وأنسجة عضلات السلمون 0.5 إلى 1.2 جزء في البليون و 0.8 و 2.0 جزء في البليون على التوالي.

تتناول المقالة الثالثة التحقق الأولي من اختبارات Charm II للكشف عن بقايا مضادات الميكروبات في سلسلة من أسماك الاستزراع المائي. توضح نتائج هذه الدراسة مدى ملاءمة تقنية Charm II كأداة فحص سريعة للكشف عن بقايا مضادات الميكروبات في مجموعة متنوعة من أنواع الأسماك عند الحدود القصوى للمخلفات (MRLs) المحددة في الإرشادات الخاصة بالاتحاد الأوروبي.

الكلمات المفتاحية: التربية المائية للأسماك المستزرعة ، المضادات الحيوية ، بقايا المضادات الحيوية ، الحد الأقصى للمخلفات ، الفرز.

Introduction générale

La pêche est une activité importante dans le monde entier. Elle contribue aux moyens de subsistance de centaines de millions de personnes en leur assurant un revenu. Elle satisfait des exigences nutritionnelles essentielles de plus d'un milliard de personnes, notamment dans les pays en développement. Elle répond à des exigences culturelles et récréatives. Ces dernières décennies, les pêches mondiales sont devenues un secteur très dynamique de l'industrie alimentaire et les états côtiers se sont efforcés de tirer parti des nouvelles possibilités en investissant dans des flottilles de pêche et des usines de transformation modernes pour répondre à la demande internationale croissante de poisson et de produits de la pêche. Suivant les statistiques de captures déclarées, la production halieutique mondiale a régulièrement progressé, passant de 19,3 millions de tonnes en 1950 à près de 80 millions de tonnes au milieu des années 1980 (FAO, 2002).

En Algérie, la consommation de poisson et de fruits de mer frais est de l'ordre de 4,5 kg/ha/an. Ce chiffre est très largement inférieur à la moyenne mondiale qui est de l'ordre de 19,4 kg/ha/an et reste en dessous des préconisations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (6,2 kg/ha/an). Dans notre pays, 99,7% des produits halieutiques proviennent de la pêche côtière et artisanale et les 0,3% restants étant issus de la pêche en eau douce pratiquée dans les barrages (carpe et barbeau essentiellement) (Chiheb, 2006).

Actuellement, différents produits vétérinaires sont utilisés en élevage des poissons, sous la responsabilité ou non des vétérinaires dans le but de lutter contre les pathologies et améliorer le rendement. Parmi ces produits, les antibiotiques occupent une place de choix.

Les antibiotiques sont des molécules chimiques ayant tout d'abord un rôle thérapeutique mais certains également sont utilisés pour leur action zootechnique combinée à l'alimentation animale.

En effet depuis les années 40-50, l'industrie agro-alimentaire s'est mise à utiliser régulièrement des antibiotiques dans l'alimentation animale comme facteur de croissance pour accroître sa productivité.

Néanmoins, leur utilisation sans contrôle peut conduire à la formation des résidus dans les produits issus de ces animaux, surtout lorsque les délais d'attente ne sont pas respectés par les utilisateurs.

Les risques potentiels liés à la présence des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale sont de plusieurs ordres : risques cancérigènes (Nitrofuranes), risques allergiques (Pénicillines, Streptomycine), risques toxiques (Chloramphénicol), modification de la flore intestinale (Tétracyclines), sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (plusieurs antibiotiques sont concernés).

C'est pourquoi nous avons fait une synthèse de trois études dont l'objectif général est la détection des résidus d'antibiotiques dans les poissons d'élevage, la première étude se fait au Ibadan, la capitale de l'État d'Oyo, dans le sud-ouest du Nigeria, concernant la deuxième étude les poissons sont pris de Jefferson (Etats-Unis), et pour la troisième étude, les échantillons sont amenés des poissonneries et des supermarchés en Belgique. Ils sont utilisés trois protocoles différents. Notre choix pour les trois articles dont le but de construire une base sur l'identification des résidus d'antibiotique par des plusieurs méthodes.

Notre étude de synthèse comporte quatre chapitres :

Le premier chapitre concerne la partie bibliographique : nous avons parlé brièvement de généralités sur l'aquaculture et sur les poissons.

Le deuxième chapitre représente des généralités sur les antibiotiques ; leur mode d'action et classification. On a cité les résidus d'antibiotiques ; facteurs de résistance, les risques présentés par eux ; le délai d'attente, LMR des antibiotiques et les résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques.

Le troisième chapitre représente le matériel et les méthodes ; nous avons montré dans cette partie l'échantillonnage effectué dans les trois régions des trois études qui sont détaillés dans notre mémoire, puis nous avons donné le volet expérimental qui comporte la recherche des résidus d'antibiotiques dans les poissons d'élevage.

Le dernier chapitre comporte les résultats et les discussions : les résultats obtenus pour chaque méthode, ainsi que les interprétations pour ces résultats des expérimentations. En fin ce document se terminera par une conclusion et des références bibliographiques.

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur l'aquaculture

I.1. Historique de l'aquaculture

La situation actuelle de l'aquaculture a connu un développement qui s'est étalé sur plusieurs étapes :

La première phase place la méditerranée comme un des berceaux de l'aquaculture puisqu'elle se situe entre 1500 années av JC et 400 années av JC. Elle concerne tout d'abord des espèces d'eau douce, capturées et maintenues en stabulation par les égyptiens sur les rives du Nil en bassin et en terre, pisciculture rudimentaire contemporain observée en Chine et en Inde. Enfin c'est au 5^{ème} siècle av JC qu'une forme rudimentaire de conchyliculture est apparue en Grèce et en Italie.

La seconde phase est celle liée au développement de la valliculture Italienne concomitante à celle de la pisciculture d'eau douce en Europe centrale. Ce développement contrairement à celle observée dans le temps archéologique, est lié non seulement à une demande de produit aquatique mais aussi à la disponibilité de région défavorisée difficilement utilisable par l'agriculture.

La troisième phase est celle du développement de la conchyliculture, cette activité est née ou pilotée et ressuscitée au début du 19^{ème} siècle, non pas en méditerranée, mais sur les côtes de l'atlantique. C'est que vers le milieu du 19^{ème} siècle que cette activité est déplacée vers les côtes méditerranéennes, on utilise les techniques adaptées à des côtes sans marées : Tables fixes aux radeaux. Les premières fermes conchylicoles s'établirent tout d'abord en Corse et à Than en France à Naples et à Tarente en Italie, puis dans divers autres sites de méditerranées occidentales et centrales au cours du 20^{ème} siècle (côte d'adriatique italienne, Croatie et Albanie ; lagunes de Tunisie, d'Algérie et du Maroc).

La quatrième phase de développement est liée cette fois-ci à un investissement scientifique sans précédent, autant qu'à des mécanismes de financement externes (Maatar et Bouhaine, 2004).

I.2. Définition de l'aquaculture

L'aquaculture est définie comme l'art de multiplier et d'élever les animaux et les plantes aquatique (Barnabe, 1991). Selon Barnabe, (1989). Le terme aquaculture recouvre toutes les activités qui ont pour objet la production, la transformation, le conditionnement et la

commercialisation d'espèces aquatiques, qu'il s'agisse de plantes ou d'animaux d'eau douce, saumâtre ou salée.

I.3. Les différents types d'aquaculture

L'aquaculture s'intéresse à plusieurs catégories de productions dont les principales :

- La conchyliculture concerne l'élevage des mollusques.
- La pisciculture qui est l'élevage des poissons.
- L'astaciaculture définissant l'élevage de l'écrevisse genre astacia.
- L'algoculture définissant la culture des algues.
- L'échinoculture concerne l'élevage des oursins.

I.4. Objectifs de l'aquaculture

Le but fondamental, au sens commun, des activités aquacoles est de produire de la matière vivante à partir de l'élément aquatique, c'est-à-dire la production pour la consommation humaine d'aliments riches en protéines. Elle consiste en fait à manipuler les milieux aquatiques, naturels ou artificiels, pour réaliser la production d'espèces utiles à l'homme.

Les objectifs de l'aquaculture sont cependant relativement variés selon le contexte économique dans lequel ils s'inscrivent.

Dans les pays industrialisés, c'est l'obtention de produits aquatiques très appréciés et de haute valeur commerciale que la pêche ne peut pas fournir en quantité suffisante. En Europe occidentale et au Japon c'est le Saumon, la Truite, le Loup, la Dorade, les Algues, Crevettes, Perles, ... En outre, dans ces pays il y a une forte demande sur les produits ayant des caractéristiques diététiques (faible teneur en graisse, richesse en vitamines et oligoéléments).

Dans les pays en voie de développement, l'objectif est de produire des protéines animales que les élevages traditionnels ne peuvent fournir en quantité suffisante du fait de la surpopulation ou de la désertification des sols. L'Inde, par exemple, connaît une production d'espèces tropicales très appréciées (Benidiri, 2017).

I.5. Impact environnemental

Les élevages des espèces aquacoles ont connu une croissance rapide durant ces dernières décennies, les trois quarts de la production sont réalisées en Asie, le quart restant en Amérique latine. D'immenses surfaces ont été défrichées pour installer des élevages ce qui entraînant une forte érosion des sols et un affaiblissement de la protection contre les crues.

Les activités aquacoles affectent l'environnement notamment la qualité de l'eau, de différentes façons;

- L'augmentation des composés liés au métabolisme des espèces aquacoles tel que les déchets organiques, les composés azotés et le phosphore.
- Le changement de la température et le pH de l'eau.
- L'augmentation des solides en suspension, des solides sédimentables liés aux aliments non ingérés.

La composition, la digestibilité et le taux de conversion des aliments conditionnent en grande partie le niveau des rejets dus à l'activité piscicole, et donc la libération dans le milieu naturel de matière organique et de nutriments. Ceux-ci peuvent amener des changements dans les écosystèmes, particulièrement les milieux aquatiques (hausse de la charge en éléments).

Les opérations de production en aquaculture nécessitent l'utilisation de produits chimiques (désinfectants, fongicides, antibiotiques...) dont l'impact sur la qualité de l'eau et les organismes aquatiques des milieux récepteurs.

I.6. Aperçu sur l'aquaculture mondiale

I.6.1. Situation mondiale de l'aquaculture

Les activités aquacoles observées depuis le milieu des années 1980, qui coïncide avec une relative stabilité de la production de la pêche de capture depuis la fin des années 1980. Parallèlement à la hausse de la production aquacole, la part du poisson d'élevage dans l'alimentation a augmenté rapidement.

L'année 2013 a été marquante à cet égard : pour la première fois, la part de l'aquaculture dans les disponibilités en poisson aux fins de la consommation humaine a

dépassé celle de la capture à l'état sauvage. La part des produits de l'aquaculture dans la consommation totale de poisson était de 56 % en 2016 contre 6 % en 1966, 14 % en 1986 et 41 % en 2006 (fig 01).

Le développement de la production aquacole, en particulier pour ce qui est des crevettes, du saumon, des bivalves, des tilapias et des carpes, transparait de façon évidente dans le taux d'augmentation relatif de la consommation par personne de différents groupes d'espèces qui a été enregistré ces dernières années. Depuis 2000, le taux d'augmentation moyen annuel est particulièrement élevé pour les poissons d'eau douce et les mollusques (FAO, 2018).

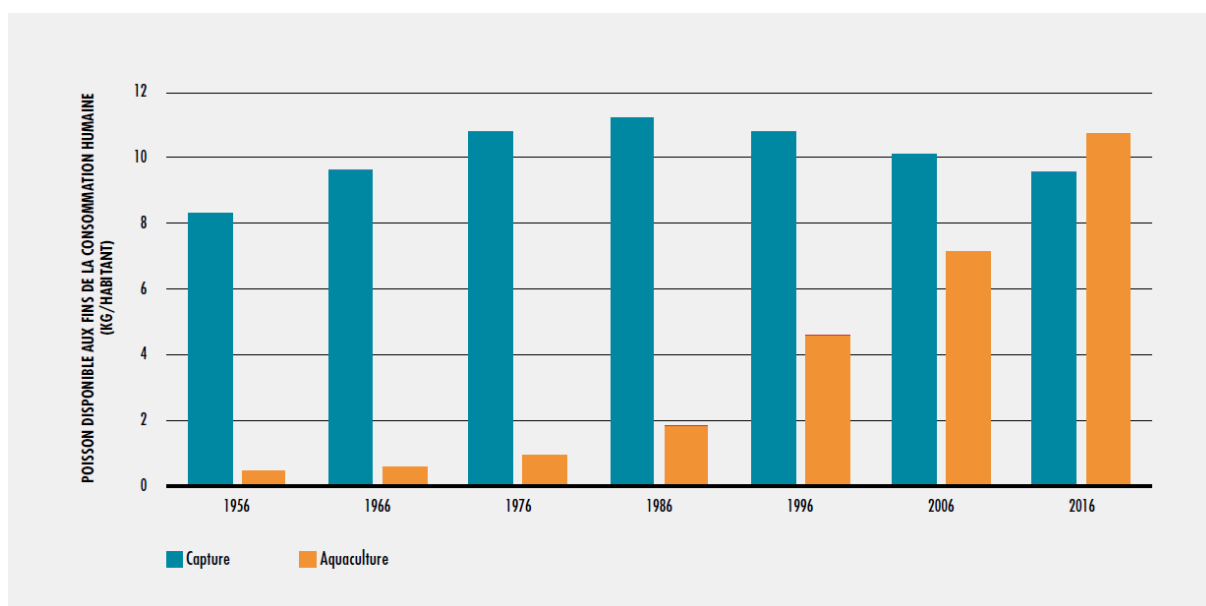


Figure 01: Part respective de l'aquaculture et de la pêche dans la consommation de poisson (FAO, 2018).

I.6.2. Comparaison de l'évolution de l'aquaculture et de la pêche

Le Programme de développement durable l'horizon 2030 correspond à la vision d'un monde plus juste et pacifique, fixe notamment des objectifs concernant la contribution de la pêche et de l'aquaculture à la sécurité alimentaire et à la nutrition, ainsi que la conduite des deux secteurs au regard de l'utilisation des ressources naturelles, dans un souci de développement durable sur les plans économique, social et environnemental. L'un des grands enjeux de la mise en œuvre de ce programme est l'écart de durabilité entre les pays développés et les pays en développement, qui résulte en partie de l'accroissement de l'interdépendance économique.

En 2016, la production halieutique mondiale a atteint 171 MT, le secteur de l'aquaculture comptant pour 47 % de ce chiffre la production de la pêche de capture étant relativement stable depuis la fin des années 1980, c'est à l'aquaculture que l'on doit la croissance continue et impressionnante de l'offre de poisson destiné à la consommation humaine (fig 02). La consommation de poisson destiné à l'alimentation humaine est passée de 9,0 kg en 1961 à 20,2 kg en 2015, à un taux annuel moyen d'environ 1,0 %. D'après les estimations préliminaires, elle a continué d'augmenter pour atteindre environ 20,3 kg en 2016 et environ 20,5 kg en 2017 (FAO, 2018).

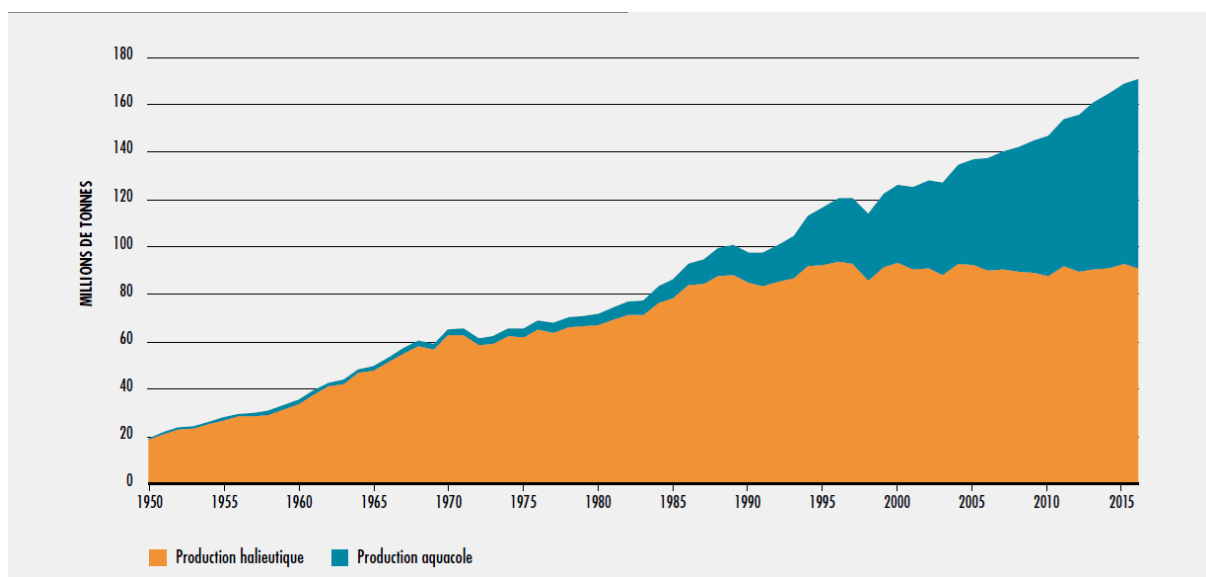


Figure 02 : Production halieutique et aquacole mondiale (FAO, 2018).

I.6.3. Production aquacole mondiale

En 2016, la production aquacole mondiale (y compris la culture de plantes aquatiques) s'élevait à 110,2 MT, pour une valeur à la première vente estimée à 243,5 milliards d'USD. La production totale se décomposait comme suit: 80,0 MT de poisson de consommation, 30 MT de plantes aquatiques (Fig 03) et 37 900 T de produits non alimentaires. La production de poisson d'élevage destiné à la consommation englobait le poisson proprement dit 50,1 MT, les mollusques 17,1 MT, les crustacés 7,9 MT et d'autres animaux aquatiques, tels que les tortues, les holothuries, les oursins, les grenouilles et les méduses comestibles 938 500 T (FAO, 2018).

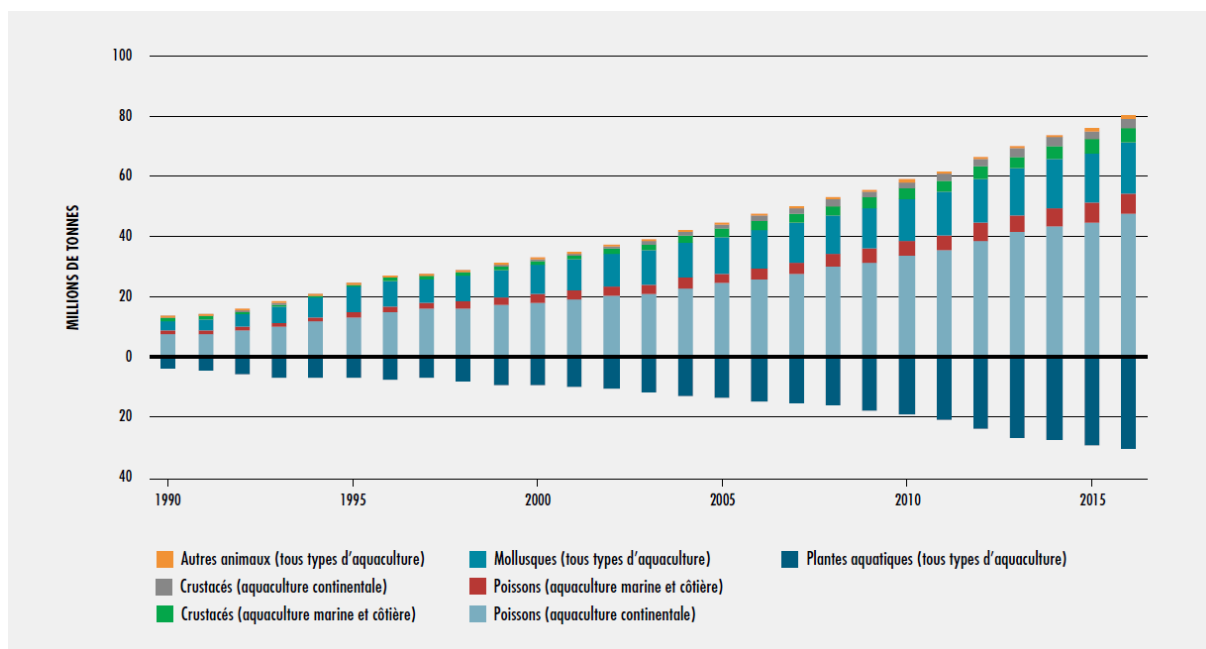


Figure 03 : Production mondiale de poisson d'élevage destiné à la consommation et de plantes aquatiques cultivées (FAO, 2018).

Depuis 2000, l'aquaculture mondiale ne connaît plus les mêmes taux de croissance que dans les années 1980 et 1990 (10,8 et 9,5 %, respectivement). Néanmoins, elle continue de se développer plus rapidement que d'autres grands secteurs de production alimentaire. La croissance annuelle a baissé pour s'établir modestement à 5,8 % sur la période 2001-2016, bien qu'une croissance à deux chiffres ait été enregistrée dans une poignée de pays, en particulier d'Afrique, entre 2006 et 2010 (fig 04).

La contribution de l'aquaculture à la production mondiale cumulée de la pêche de capture n'a cessé d'augmenter: elle est passée de 25,7 % en 2000 à 46,8 % en 2016. Si l'on exclut la Chine, la part de l'aquaculture a atteint 29,6 % en 2016, contre 12,7 % en 2000. Au niveau régional, l'aquaculture représentait 17 à 18 % de la production totale de poisson en Afrique, aux Amériques et en Europe, et 12,8 % en Océanie. En Asie (hors Chine) (FAO, 2018).

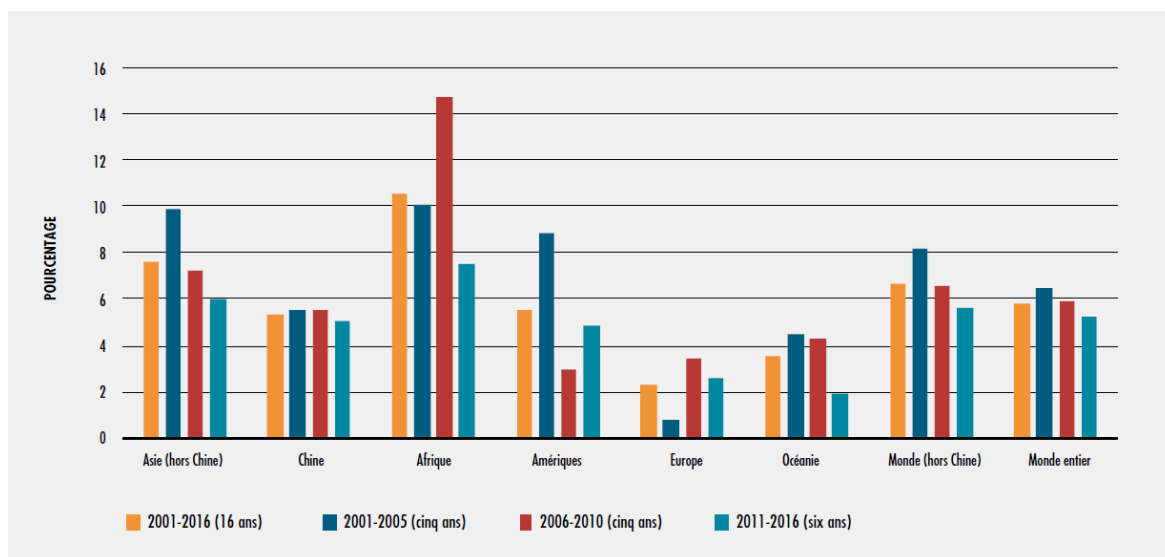


Figure 04: Taux de croissance annuel moyen de la production aquacole (hors plantes aquatiques) (FAO, 2018).

I.6.4. Évolution de la production aquacole mondiale par groupes d'espèces

La figure ci-dessous (fig 05) montre une prédominance des produits de l'aquaculture d'eau douce depuis les années 1970 et qui continue de croître jusqu'à l'heure actuelle. Vient en seconde position, l'élevage des mollusques bivalves suivi de l'élevage de crustacés (FAO, 2008). La période 2000-2006 a été caractérisée par une forte poussée de la production de crustacés et, dans une moindre mesure de poissons marins. La croissance de la production des autres groupes d'espèces entame un ralentissement, et le taux global de croissance, même s'il n'est pas quantité négligeable est loin des extrêmes enregistrées pendant les deux dernières décennies.

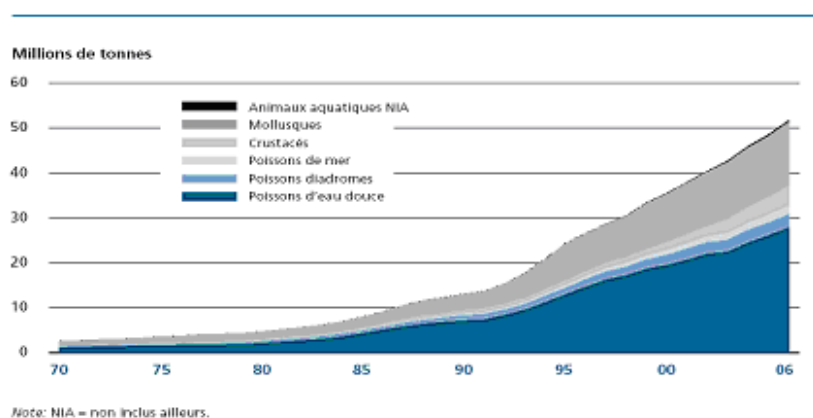


Figure 05 : Evolution de la production aquacole mondiale par groupes d'espèces (FAO, 2008).

I.7. L'aquaculture méditerranéenne

I.7.1. Evolution de la production

L'aquaculture est devenue une activité majeure en méditerranée, représentant un apport de 400 000 tonnes dont 250 000 tonnes environ d'aquaculture marine en 1995 (contre 200 000 tonnes, dont 85 000 tonnes de produits marins en 1985), sur un total d'apport de la mer de 1 365 000 tonnes pour l'ensemble de la méditerranée. Le potentiel aquacole de la méditerranée est depuis longtemps reconnu et pratiquement tous les pays de son littoral, et en particulier ceux du sud de l'Europe ont apporté un soutien considérable à ce secteur, tant au niveau de la recherche que du développement (Ferlin, 2008).

I.7.2. Evolution de la production aquacole des différents pays

En ce qui concerne la production aquacole, elle est dominée par certains pays, à savoir l'Egypte, la France, l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Turquie. Mais c'est l'Egypte qui a enregistré la plus forte évolution au cours de ces dernières années. Ces six pays fournissent 95 % de la production aquacole totale de la méditerranée (CIHEAM, 2008). Alors qu'en Espagne, en France et en Italie, cette production repose essentiellement sur les mollusques (moules, huîtres, palourdes), en Egypte, la production repose en revanche sur la production semi-intensive de poissons d'eau douce (tilapia et carpe) et de poissons marins (mulet). En Grèce et en Turquie, l'accent y est mis sur la production intensive de poissons (dorade, bar et truite). La production a atteint en 2007 pour ces six principaux pays producteurs plus de 1 585 892 tonnes (fig 06), (FAO, 2009).

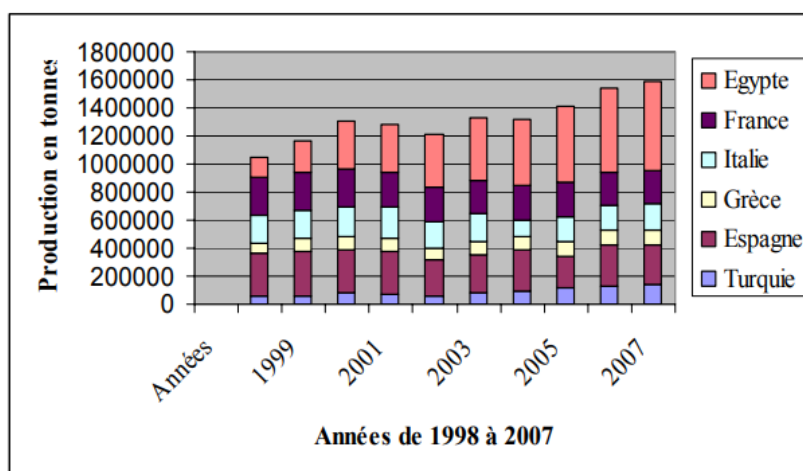


Figure 06 : Production aquacole des principaux pays producteurs en méditerranée (FAO, 2009).

I.7.3. Evolution de la production des principales espèces

Une des caractéristiques de l'évolution de l'aquaculture méditerranéenne est la diversification des espèces d'élevage dont le nombre est passé de 18 en 1981 à 40 en 2001 (Basurco. Personal data, 2004).

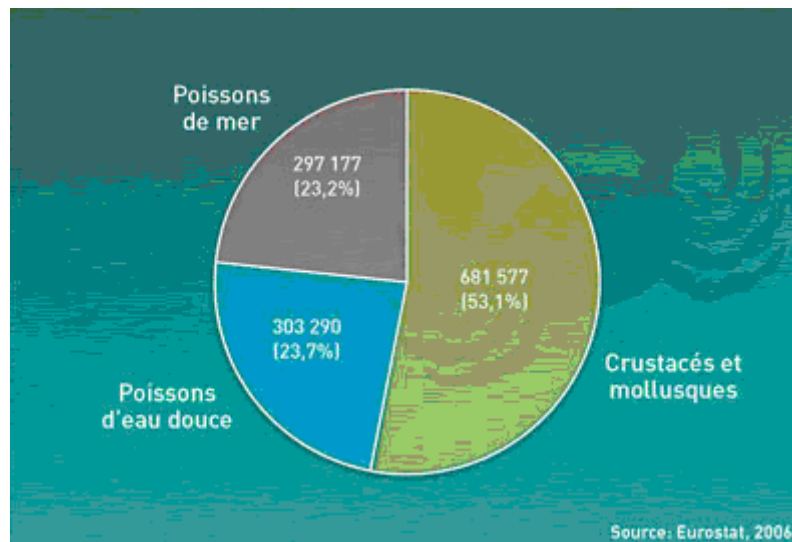


Figure 07 : Quantités produites en pourcentage de la production totale (Eurostat, 2006).

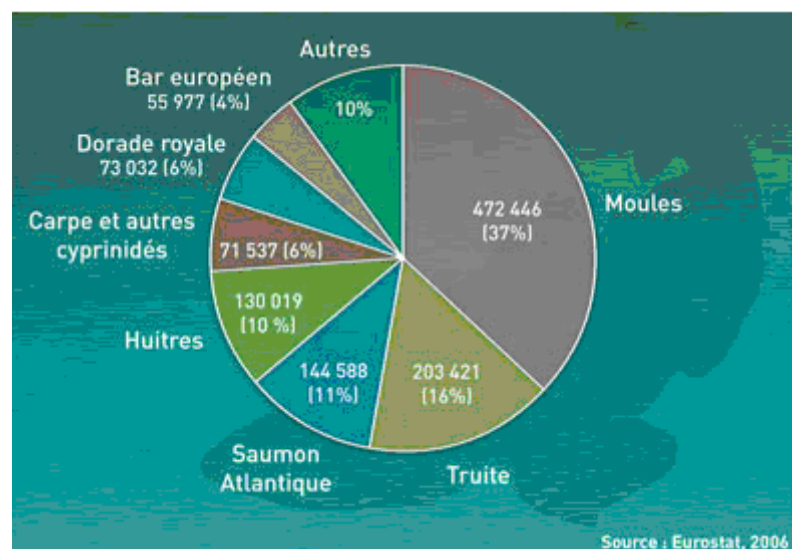


Figure 08 : Principales espèces aquacoles produites dans les pays de l'Union Européenne.

En Europe la production aquacole du Bar et de la Dorade est la plus élevée comparée à celle des autres espèces de poissons (fig 09).

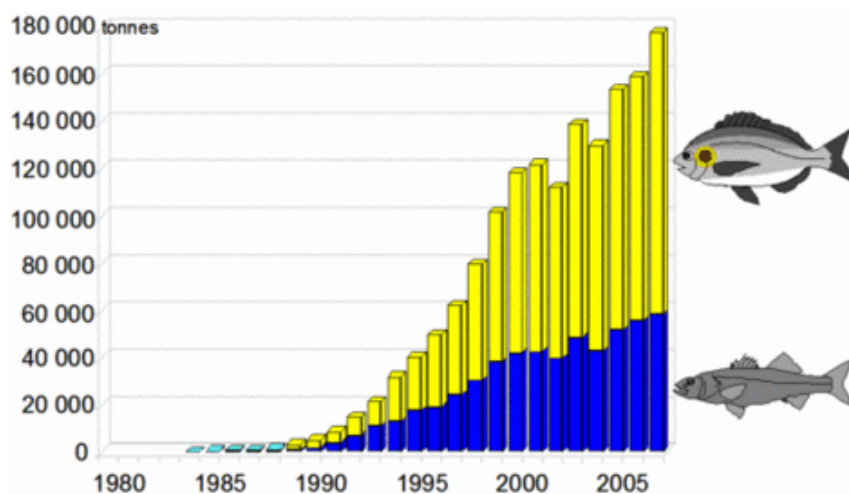


Figure 09 : Production européenne du Bar et de la Dorade (FAO, 2009 - données 2007).

I.8. L'Aquaculture en Algérie

L'aquaculture se développe, s'étend et s'intensifie dans presque toutes les régions du monde, excepté en Afrique subsaharienne. (Hamdi et Sibachir, 2011) L'Algérie, de par son milieu naturel riche et varié, tant au point de vue des reliefs et des faciès, dispose d'un milieu écologiquement propice pour le développement de l'aquaculture et dispose de potentialités importantes :

- Sites littoraux ;
- Eaux de refroidissement des centrales thermoélectriques ;
- Lacs naturels et oueds ;
- Barrages et retenues collinaires ;
- Ressources en eaux des zones semi-arides ;
- Zones humides d'intérêt piscicole.

En fait les premiers essais d'aquaculture en Algérie remontent à plus d'un siècle. Mais en 1921 elles revêtaient beaucoup plus le caractère universitaire de recherche et d'expérimentation des entreprises essentiellement sur : les mollusques, la crevette, le mullet et la carpe.

Plusieurs centres spécialisés ont vu le jour pour encadrer scientifiquement et techniquement ces opérations :

- Station aquacole de Castiglione
- L'Aquarium de Beni-Saf.
- La station Océanographique du port d'Alger.
- la station Hydro-biologique du Mazafran. (Karali et Echikh, 2004)

Le développement de l'aquaculture en Algérie a évolué suivant trois (3) périodes :

- Première période (XIX^{ème} siècle –1962);
- Deuxième période (1962 -1993);
- Troisième période (1993 -2010) (Seridi F, 2011)

Selon le biologiste français « Novella » les premiers essais furent en 1880 au niveau de l'embouchure d'Arzew.

Différentes opérations ont marquées l'histoire de l'aquaculture algérienne.

Tableau 01 : Historique des fermes aquacoles en Algérie (Karali et Echikh, 2004).

Année	Station Aquacole
1921	Création de la station d'aquaculture et de pêche de Bousmail avec pour objectif : Détermination des meilleurs sites pour la conchyliculture et la pisciculture.
1937	Création de la station d'alevinage du Grib (empoissonnement en truites arc en ciel).
1940	Exploitation des lacs Oubeira et El Mellah et Tonga avec culture de coquillages
1947	Création de la station Mazafran, dans l'optique de repeuplement en poissons d'eau douce et de recherches hydro biologiques
1962/1980	L'après indépendance, la quasi totalité des actions ont été menées sur les lacs de l'est et sur la station de Mazafran
1973	Mise en valeur du lac El mellah, pour l'installation des tables conchylicoles.
1974	Une étude de mise en valeur du lac Oubeira a conduit à un projet d'installation d'une unité de fumage d'anguilles
1978	Un programme de coopération avec la Chine a été mis en place, centré sur 2 axes: -Initiation aux techniques de reproduction et d'alevinage pour le repeuplement ; -Tentatives d'élevage larvaire de crevettes <i>Peneus kerathurus</i>
1982 à 1990	Exploitation de l'anguille aux lacs Tonga, Oubeira et Mellah par un privé. la production annuelle moyenne était de l'ordre de 80 tonnes exporté vers l'Italie
1983/ 1984	Premiers travaux de réalisation d'une écloserie de loup au lac El mellah.

1985/ 1986	Des reervoirs d'eau furent peuplés ou repeuplés en poissons importés de Hongrie: carpes royales, carpes à grande bouches, carpes herbivores, carpes argentées, sandres
1987	Filière sub-surface installée par l'ONDDPA
1989	Implantation d'une éclosérie type mobile à Harreza pour la reproduction de carpes (10 millions de larves), une autre éclosérie de carpes à double capacité que la première a été implantée à Mazafran
1991	Dans le cadre de repeuplement, 6 millions d'alevins de carpes ont été lâchés dans les plans d'eau des barrages Baraka, Gargar, Meurdjet-El amel, Benaouda, Oubeira.
2000	Création d'un comité national autour du sujet : Aquaculture en Algérie ; ce qui a aboutit à des résultats importants du point de vue perspectives, ainsi un établissement du plan national d'aquaculture en Algérie.
2001	Début de la première campagne d'élevage d'alevins, ainsi qu'une exploitation plus ample de sites aquatiques à travers le territoire national (côtière, intérieure, Saharienne)

Durant les années de 1921 à 1993 aucune politique durable n'a permis de promouvoir le secteur de l'aquaculture.

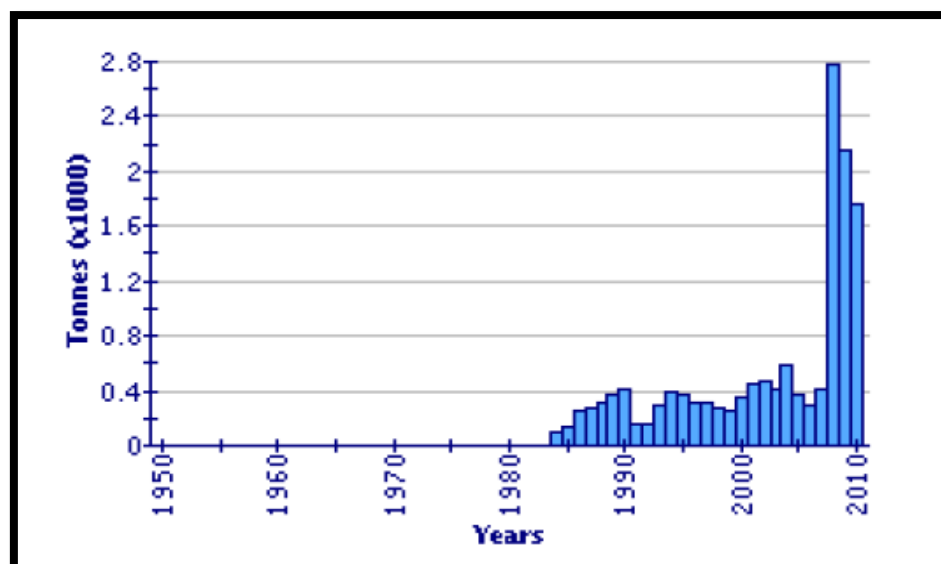


Figure 10 : Production de l'aquaculture reportée en Algérie (depuis 1950) (Statistiques de pêche de la FAO, 2006).

I.9. Généralité sur les poissons

Les poissons sont généralement définis comme des vertébrés aquatiques à sang froid, organisés pour vivre dans l'eau et pour respirer par l'intermédiaire de ce liquide.

Ils ont des formes extrêmement variées. Il y en a qui sont arrondis, d'autres qui sont allongés et presque cylindriques comme des serpents (les Anguilles, par exemple), mais parmi eux, la forme oblongue, comprimée latéralement, atténuée aux deux extrémités et surtout à l'extrémité postérieure, est la plus ordinaire. Chez tous néanmoins, quelle que soit leur forme générale, la tête est en continuité avec le tronc; il n'y a aucun rétrécissement semblable au cou de mammifères des oiseaux ou des reptiles (Blanchard, 1866).

Un caractère très-ordinaire chez ces animaux, mais qui est loin cependant d'être commun à toutes les espèces consiste dans la présence d'écaillés sur le corps. Les poissons conformés essentiellement pour la natation, plongés dans un liquide presque aussi lourd qu'eux-mêmes, ont des organes de locomotion réduits à des proportions très-médiocres. Les parties correspondantes aux membres antérieurs et postérieurs des vertébrés, sont peu développées et plus ou moins complètement cachées sous les téguments; les mains et les pieds sont représentés par des tiges grêles, habituellement désignées sous le nom rayons, qui soutiennent une membrane; ce sont les nageoires. Celles qui répondent aux membres antérieurs portent le nom de pectorales; celles qui répondent aux membres postérieurs, le nom de ventrales. En outre, des rayons fixés à des os particuliers placés tantôt sur les apophyses des vertébrés, tantôt entre ces vertébrés soutiennent des nageoires verticales. Il y en a qui s'élèvent sur le dos et qu'on appelle les nageoires dorsales; il y en a une autre, attaché à la face inférieure du corps, en arrière de l'orifice anal, qu'on nomme la nageoire anale; une enfin située au bout de la queue, qui est la nageoire caudale. Les caractères les plus importants des poissons sont fournis par l'appareil respiratoire et par l'appareil de la circulation du sang (Blanchard, 1866).

I.9.1. Typologie des poissons en fonction de la température et l'oxygène

Tous les poissons ne présentent pas les mêmes exigences vis-à-vis de deux paramètres environnementaux d'une grande importance: l'oxygène et la température.

I.9.2. Température

La température est un paramètre d'autant plus important, elle conditionne la distribution spatiale des espèces et joue un rôle dans les migrations et les déplacements. Les poissons se trouvent dans la gamme comprise entre 0 et +40 °C:

- **Espèces d'eau très froide et froide** : dites «psychrophiles» supportent des températures voisines de 0°C;
- **Espèces d'eau tempérée froide (<19°C)**: les optima thermiques varient sensiblement pour une espèce donnée, en fonction de la localisation géographique (intervention d'autres facteurs environnementaux) ;
- **Espèces d'eau tempérée chaude (18-27°C)**;
- **Espèces d'eau chaude (> 28°C)**.

Les différentes espèces peuvent aussi se distinguer en fonction de leur capacité à supporter les variations de température. Les espèces sont dites sténothermes si elles ont une faible tolérance aux variations de température; elles sont dites eurythermes quand elles supportent assez bien les fortes variations thermiques saisonnières (Keith *et al.*, 2011).

I.9.3. Oxygène

Le taux d'oxygène dissous dans l'eau est un facteur vital pour tous les poissons. La solubilité de l'oxygène dans l'eau diminuant quand la température augmente, les exigences des espèces vis-à-vis de ce paramètre sont souvent abordées conjointement avec les préférences thermiques. Certaines espèces sont très exigeantes comme les Salmonidae (5 à 8 mg O₂/L), d'autres espèces peuvent survivre dans les eaux faiblement oxygénées comme la carpe dont la limite de tolérance inférieur est de 2 mg O₂/L. En général, les espèces d'eau froide sont aussi des espèces exigeantes en oxygène dissous (Keith *et al.*, 2011).

I.9.4. Typologie des poissons en fonction de la salinité du milieu

Toutes les espèces n'ont pas la même tolérance vis-à-vis des variations de salinité. Les espèces les plus tolérantes, euryhalines, peuvent vivre dans les milieux saumâtres des estuaires ou des lagunes. Les moins tolérantes, sténohalines vivent exclusivement en eau douce ou exclusivement en milieu marin. On distingue ainsi parmi les poissons des eaux continentales, des espèces dite «primaires» qui ne tolèrent pas l'eau de mer, d'autres

dites «secondaires» dont la tolérance à l'eau de mer est suffisante pour qu'ils y parcourent de faibles distances. D'autres encore effectuent ou non des migrations régulières entre les eaux douces et l'eau de mer, et sont regroupées en espèces diadromes (Keith *et al.*, 2011).

I.9.5. Chair des poissons

Le poisson est un produit carné dont la qualité nutritionnelle est proche de celle de la viande. La chair du poisson contient en moyenne 70 à 80% d'eau, 16 à 22% de protéines, et des lipides en quantité très variable en allant de 0,5 à 20% selon les espèces et leurs alimentations (Médale, 2005). La chair est très pauvre en glucides, sous forme de glycogène, sa teneur est généralement inférieure à 1%. La teneur en collagène est faible, habituellement inférieure à 3% (Regost, 2001). De plus, la chair des poissons se distingue des autres animaux producteurs des viandes à la fois par l'organisation structurale des muscles et par ses composants (Médale, 2009).

I.9.6. Structure

La structure et la texture de la chair du poisson se différent de celle des autres animaux. Elle est constituée de deux types de muscles:

- **Le muscle brun (rouge)** : est généralement présent sous forme d'une fine couche située sous la peau; il est plus abondant sur les flancs du poisson (le long de ligne latérale). Sa proportion dans la chair varie d'une espèce à l'autre. Ce muscle participe au déplacement du poisson ce qui explique sa forte vascularisation. Il est considéré comme un muscle de croisière, c'est-à-dire utilisé pour les mouvements continus et lents. Il contient de lipide, de collagène, d'hémoglobine, de glycogène et la majorité des vitamines (Bendixsen et Jobling, 2003; Médale, 2009).
- **Le muscle blanc** : quantitativement le plus important puisqu'il représente jusqu'à 50% de la masse corporelle du poisson et peut constituer jusqu'à 90% de la masse squelettique (Rome *et al.*, 1988). Il se compose de fibres à contraction rapide et à métabolisme anaérobie de type glycolytique. C'est un muscle de propulsion sollicité lors de la nage intense de mouvements rapides et soudains (Leduc, 2011).

I.9.7. Composition chimique

Il existe une forte disparité dans certains constituants de la chair des poissons en fonction des habitats géographiques et des habitudes alimentaires. Cependant la plupart des

espèces de poissons partagent des caractéristiques communes: la chair est particulièrement riche en protéines solubles hautement digestibles de haute valeur biologique dont la teneur est comparable à celle des autres produits carnés. La teneur en protéine de la chair du poisson semble être stable chez toutes les espèces. Elle augmente progressivement lors de la croissance pour se stabiliser à une valeur proche de 20% (Lefèvre *et al.*, 2008). En revanche la teneur lipidique et en micronutriments varient considérablement d'une espèce et d'un individu à l'autre en fonction de l'âge, l'environnement, le sexe, de la saison, la ponte et est surtout corrélée avec le régime alimentaire (Médale, 2004).

Tableau 02 : Composition des filets de diverses espèces de poissons d'eau douce (Murray et Burt, 1969 ; Poulter et Nicolaidis, 1985a ; Poulter et Nicolaidis, 1985b).

Espèce	Nom scientifique	Eau (%)	Lip (%)	Pro (%)	Valeur énergétique (KJ/100)
Anguille	<i>Anguilla anguilla</i>	60-71	8.0-31.0	14.4	295-332
Saumon	<i>Salmo salar</i>	67-77	0.3-14.0	21.5	-
Truite	<i>Salmo trutta</i>	70-79	1.2-10.8	18.8-19.1	-
Carpe	<i>Cyprinus carpio</i>	81.6	2.1	16.0	-

I.9.7.a. Composés lipidiques

Les lipides sont présents sous deux formes dans les muscles des poissons:

➤ Lipides polaires ou phospholipides (lipides de structure)

Ce sont les composants majeurs des membranes cellulaires, leur teneur et leur composition sont relativement constantes contiennent également du cholestérol (Cahu *et al.*, 2003).

➤ Lipides neutres ou lipides de réserve

Sont constitués essentiellement par des triglycérides. La teneur en triglycéride est extrêmement variable en fonction de l'espèce, de l'âge, de la taille des poissons, de leur état de maturité sexuelle et du contenu énergétique de leur alimentation (Médale, 2008).

En fonction de la capacité du tissu musculaire à stocker les lipides, les poissons peuvent être répartis en trois groupes:

- **Poissons maigres** dont la teneur en lipides dans le muscle est inférieure à 1% ;
- **Poissons gras** dont la teneur en lipides dans le muscle est supérieure à 5% ;
- **Poissons «intermédiaires» ou semi-gras** dont la teneur en lipides est comprise entre 1 et 5% (Médale, 2009).

I.9.7.b. Composés protéiques

Les protéines sont les constituants majeurs des tissus de poissons. La teneur en protéines des tissus musculaires semble être remarquablement constante chez les poissons avec une valeur moyenne de 18.5% (Médale, 2004).

Les protéines des tissus musculaires des poissons peuvent être divisées en trois groupes:

- Protéines structurelles constituent 70 à 80% des protéines totales;
- Protéines sarcoplasmiques représentent 10 à 30% des protéines totales;
- Protéines du tissu conjonctif (protéines insolubles) constituent environ 3 à 10% des protéines totales (Leduc, 2011).

Tableau 03 : Pourcentage d'acides aminés essentiels de différentes protéines (Braekkan, 1976 ; Moustgard, 1957).

Acide aminé	poisson	lait	bœuf	œuf
Lysine	8.8	8.1	9.3	6.8
Tryptophane	1	1.6	1.1	1.9
Histidine	2	2.6	3.8	2.2
Phénylalanine	3.9	5.3	4.5	5.4
Leucine	8.4	10.2	8.2	8.4
Isoleucine	6	7.2	5.2	7.1
Thréonine	4.6	4.4	4.2	5.5
Méthionine-cystéine	4	4.3	2.9	3.3
valine	6	7.6	5	8.1

I.9.7.c. Glucides

Les glucides peuvent aussi être répartis en trois groupes : les sucres (mono et disaccharides), les oligosaccharides (3 à 9 monosaccharides), et les polysaccharides (plus de 9). La teneur en glucide dans le muscle du poisson est faible et influencée par les conditions de capture, qui peut conduire à l'épuisement des réserves de glycogène et aussi une diminution du niveau de glucide (Mendel *et al.*, 1954; Schulz *et al.*, 2005).

I.9.7.d. Fraction azotée non protéique

Huss en (1995) a décrit les extraits azotés comme étant des composés de nature non protéique, solubles dans l'eau, de faible poids moléculaire et renfermant de l'azote. Cette fraction constitue de 9 à 18% de l'azote chez les poissons. Elle se compose principalement: des bases volatiles telles que l'ammoniaque et l'oxyde de triméthylamine, des acides aminés libres, des nucléotides et des bases puriques.

I.9.7.e. Vitamines et sels minéraux

La teneur en vitamines et en sels minéraux est spécifique aux espèces et peut, de plus, varier selon la saison. En général, la chair de poisson est une bonne source de vitamines B et également, dans le cas des espèces grasses, de vitamines A et D. Quelques espèces d'eau douce comme la carpe ont une grande activité thiaminase et, de ce fait, leur teneur en thiamine est généralement basse. En ce qui concerne les éléments minéraux, la chair du poisson est considérée comme une source appréciable de calcium et de phosphore en particulier mais également de fer, cuivre et sélénium. Les poissons d'eau de mer ont une forte teneur en iode (Maage *et al.*, 1991)

I.9.8. Fabrication des aliments destinés aux poissons

La fabrication d'un aliment composé consiste en une série d'opérations dont le but est d'associer plusieurs matières premières dans des proportions fixées à l'avance pour un objectif nutritionnel précis. Cette association est réalisée par mélange de composants sous forme solide (farines animales, tourteaux, produits céréaliers, minéraux, vitamines) ou sous forme liquide (huile de poissons). Un broyage préalable des composants solides les plus grossiers restreint l'hétérogénéité du produit et en accroît dans une certaine mesure l'utilisation digestive (Guillaume *et al.*, 1999).

Les ingrédients étant mélangés entre eux, l'aliment est ensuite mis en forme. Plus aisé à transporter et à manipuler, il est aussi plus facile à saisir par des animaux et permet de limiter la pollution des bassins. La texturation est l'opération clé permettant d'adapter l'aliment au comportement alimentaire de l'animal.

Les aliments destinés aux poissons et aux crustacés renferment des matières premières qui sont des coproduits d'autres industries (huilerie, amidonner maïserie), ou des produits élaborés spécifiquement (farines de poissons, huiles). Toutes ces matières premières ont à des degrés divers, subi des traitements technologiques variés avant d'être associées dans un aliment composé. La diversité des présentations (miettes, granulés de différentes tailles) et des propriétés (résistance mécanique aux manipulations et au délitement dans l'eau, aptitude à se réhydrater, à couler, à flotter) demandée aux aliments pour animaux aquatiques impose des adaptations importantes des chaînes de fabrication existantes. La plupart du temps, les fabricants préfèrent concevoir des chaînes spécialisées qui associent, en les adaptant, des opérations particulières traditionnelles (broyage, dosage, mélange) et des opérations particulières plus spécifiques (pressage, extrusion, séchage, enrobage, émiettage) (Guillaume *et al.*, 1999).

Chapitre II

Généralités sur les

antibiotiques

II.1. Historique

Fleming Alexander a découvert les ATB en 1929. Au cours d'examens de routine de cultures de staphylocoques en boîtes de pétri au Saint Mary's hospital de Londres, il a remarqué la croissance accidentelle de quelques moisissures de *Penicillium notatum* autour desquelles les colonies bactériennes ne cultivaient pas. Il émit l'hypothèse que ce champignon devait sécréter une substance nuisible à la croissance des staphylocoques, et il a prouvé que le bouillon filtré de ce champignon permet de reproduire ce phénomène. Ils sont aussi préparés en 1935, les sulfamides et par la suite de nombreux antibiotiques ont été aussi préparés à partir de champignons inférieurs, aussi des bactéries telluriques les plus productrices d'ATB. Les tétracyclines sont découvertes dans les années 1950 (Duval et Soussy, 1990; Puyt et Guérin-Faubleé, 2006).

II.2. Définition d'un antibiotique

C'est une substance antibactérienne d'origine biologique, produite par des microorganismes, ou de synthèse chimique, capable d'inhiber la vitalité d'autres microorganismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux de germe (Gogny *et al.*, 2001 ; Morin *et al.*, 2005).

II.3. Mode d'action des antibiotiques

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent de façon spécifique sur certaines structures de cellule bactérienne ; cette spécificité d'action s'explique pourquoi les ATB sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés (fig 11) (Mevius *et al.*, 1999 ; Oxoby, 2002) :

- Sur la paroi bactérienne : en inhibant la dernière étape de la biosynthèse de peptidoglycane au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne.
- Sur la membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.
- Sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.
- Sur l'ADN : en empêchant sa réplication et en inhibant la biosynthèse protéique.

- Autre : en agissant autant qu'antimétabolites bactériens. (Mevius et al, 1999 Oxoby, 2002)

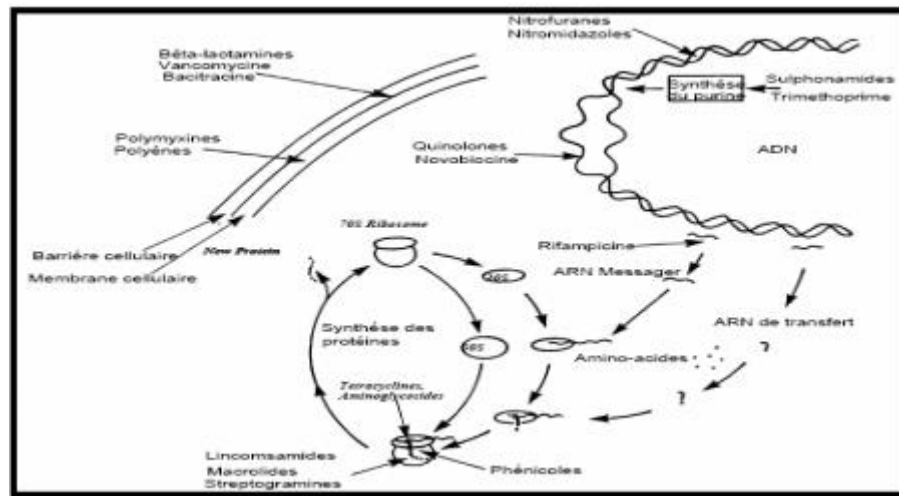


Figure 11: principaux sites d'action des ATB (Mevius et al, 1999;Oxoby, 2002;Puyt et Guérin-Faubleé, 2006; Errecalde, 2007).

II.4. Pharmacocinetique des antibiotiques

L'ATB doit parvenir à son site d'action pour éradiquer une infection. Le passage du lieu d'administration jusqu'au site(s) d'action se fait en quatre phases différentes (Potel *et al.*, 2006) :

- L'absorption
- La distribution
- Les transformations
- L'excrétion

II.5. Classification des antibiotiques

Les ATB sont classés en fonction d'origine, de nature chimique ou de mode d'action. Parmi ces ATB ; on a des β -lactamines, des tétracyclines, des aminoglycosides, des macrolides, des glycopeptides, des sulfamides et des fluoroquinolones qui sont les plus importants (Kummerer, 2009). Le tableau (04) présente les familles d'ATB.

Tableau 04 : les grandes familles d'anti infectieux (Talbert et al, 2009).

β-LACTAMINE	Pénicillines (pénème)	Groupe G	Activité : bactéricide Mécanisme d'action : inhibition de synthèse de paroi des bactéries en phase de croissance
		Groupe M (mécicilline) (antistaphylococcique)	
		Groupe A (ampicilline) (aminopénicilline)	
		Carboxypénicilline- Urédopénicilline	
		amidinopénicilline	
	Carbapénème (pènème)	Imipènem-Ertapènem- Méropènem	
	Céphalosporine (céphème)	1 ^{er} génération- 2 ^{ème} génération- 3 ^{ème} génération	
	Monobactames	aztréoném	
Inhibiteurs irréversibles des β-lactames (en association)			
Acide clavulanique-sulbactame-tazobactam			
AMINOSIDES (aminoglycoside)		Activité : bactéricide Mécanisme d'action : inhibition de synthèse protéique	
PHENICOLES		Activité : bactériostatiques Mécanismes d'action : inhibition de synthèse protéique	
CYCLINES	Tétracycline	Activité : bactériostatique Mécanisme d'action : inhibition de synthèse protéique	
	Glycycycline		
MACROLIDES	Macrolides	Activité : bactériostatique Mécanisme d'action : inhibition de synthèse protéique	
	Macrolides apparentés		
	Macrolides associés		
POLYPEPTIDES (polymyxine)		Activité : bactéricide Mécanisme d'action : inhibition de synthèse de membrane cytoplasmique	
SULFAMIDES		Mécanisme d'action : inhibition de synthèse d'acide folique	
IMIDAZOLES		antiparasitaire	
QUINOLONONES	Quinolone urinaire- fluoroquinolones systémiques	Activité : bactéricide. Mécanisme d'action : inhibition de synthèse d'ADN bactérien	
	Quinolone dite antipneumococque		
ANTIBIOTIQUE S DIVERS	Rivamycines-glycopeptides-oxazolidine-lipopeptide cyclique-acide fusidique	Activité : bactéricide. Mécanisme d'action : inhibition de synthèse protéique ; inhibition enzymatique du métabolisme bactérien ; inhibition de synthèse de paroi bactérienne	

Toutefois on est souvent conduit en thérapeutique anti-infectieuse à associer plusieurs ATB soit :

- Pour retarder l'apparition d'antibiorésistance microbienne (uniquement chromosomique).
- Pour assurer l'ouverture d'ATB en urgence devant une infection à germes inconnus lors d'infection polybactériennes.
- Afin de rechercher une synergie.
- Afin de limiter les effets indésirables. (Kummerer, 2009)

II.6. Usage des antibiotiques en médecine vétérinaire

Les ATB peuvent être utilisés de 4 manières, avec des objectifs variables :

- Les ATB sont utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité.
- Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie (s), l'ensemble de groupes d'animaux est traité.
- Les ATB peuvent, être administrés à des périodes critiques de leur vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue, après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire.
- L'usage des ATB dans l'aliment à titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance a fait l'objet de nombreuses critiques. Ces ATB régulateurs de flore (ARF) ou ATB promoteurs de croissance sont utilisés à des doses très faibles, et sont tous des agents chimio thérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur. (Duval et Soussy, 1990; Fontaine, 1992)

II.7. Conséquences négatives d'utilisation des antibiotiques chez les animaux

- Présence de résidus dans les produits alimentaires d'origine animale.
- Contamination d'environnement. (Klotin, 2006)

Ces conséquences sont dues aux mauvaises pratiques : produits du marché noir, administration sans prescription vétérinaire, non-respect des doses et des délais d'attente (Scippo, 2008).

II.8. Les résidus d'antibiotiques

II.8.1. Définition des résidus

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

II.8.2. Facteurs de persistance des résidus

La persistance des résidus varie selon plusieurs facteurs :

- Facteurs liés au médicament lui-même: la forme physique et chimique du médicament interviennent dans son absorption et sa distribution dans l'organisme.
- Facteurs liés au mode et à la voie d'administration: les antibiotiques sont administrés aux animaux par différentes voies, c'est-à-dire par injections, oralement dans l'eau ou la nourriture, par voie cutanée ou par des infusions intra mammaires ou intra utérines.
- Facteurs liés à l'animal: correspondent essentiellement à son espèce mais également à l'âge et à l'état pathologique.

Il existe de différences notables sur ces points entre les différents antibiotiques. Ainsi pour réduire l'incidence de ces résidus, sont conseillées sous forme de «liste positive », l'utilisation sélective de molécules et de certaines formes d'administration (Nouws et Verdyk, 1991).

II.8.3. Les risques présentés par les résidus

Selon Scippo (2008) les risques présentés par les résidus suite à leur utilisation chez les animaux sont de 4 ordres :

II.8.3.1. Risques pour la santé publique

II.8.3.1.a. toxicité directe

Les ATB qui présentent une toxicité sont le chloramphénicol et nitrofurannes dont leur utilisation est actuellement interdite.

Certains sulfamides sont foetotoxiques à forte dose. Ils passent dans le lait maternel, et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un mois. Ils ont des effets néfastes sur le matériel génétique, la reproduction, la fertilité et une toxicité pour les systèmes nerveux et immunitaire (Châtaigner et Stevens, 2005).

II.8.3.1.b. les réactions allergiques

L'allergie est un effet secondaire reconnu des ATB et en particulier des β -lactames. Quand aux macrolides, ils causent peu d'effets secondaires et seulement très peu d'entre eux semblent causés par des mécanismes allergiques. Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'ATB administrées lors de traitement, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu (Châtaigner et Stevens, 2005).

II.8.3.1.c. L'antibiorésistance

L'émergence rapide de l'antibiorésistance est un problème majeur pour la santé publique (OMS, 2007). Les infections microbiennes ne seront plus traitées avec les antibiotiques. Les antibiotiques sont aussi des médicaments essentiels dans la transplantation des organes, le traitement du cancer par la chimiothérapie et la chirurgie orthopédique (CARS *et al.*, 2008). Les données de la surveillance montre qu'il y'a une augmentation des infections causées par les bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans plusieurs pays (EFSA, 2007). L'émergence de l'antibiorésistance est originalement causée par l'usage excessif et inapproprié des antibiotiques en médecine humaine, médecine vétérinaire, l'élevage, l'agriculture et l'aquaculture (Tenover et Hughes, 1996).

Il est à noter qu'une bactérie est considérée comme résistante lorsqu'elle peut se développer au contact d'une teneur en antibiotique 8 à 10 fois supérieur à la concentration minimale inhibitrice moyenne de son espèce (Enriquez, 2002).

II.8.3.1.c.1. Mécanisme d'acquisition de l'antibiorésistance

L'acquisition de cette résistance bactérienne peut être due à plusieurs mécanismes:

- L'apparition d'une mutation génétique et la sélection naturelle des bactéries résistantes si celle-ci sont placées de façon répétée dans un milieu contenant des antibiotiques.
- Le transfert de plasmide entre des bactéries résistantes et sensibles (Klein, 1999).

Ce transfert de plasmide peut se faire entre des bactéries d'espèces différentes (Okolo, 1986) ce qui autorise alors des échanges entre les bactéries d'origine alimentaire et les bactéries du tube digestif de l'Homme (Vandenbogaard, 2001).

II.8.3.1.c.2. Mécanisme de résistance

Les mécanismes de résistances sont multiples et variés. On peut citer la synthèse d'enzymes bactériennes capables de modifier la molécule antibiotique et ainsi de l'inactiver, la modification/protection de la cible de l'antibiotique, la synthèse d'enzymes capables de court-circuiter la voie métabolique dans laquelle intervient l'antibiotique, la diminution de la perméabilité bactérienne ou encore la mise en place d'un système actif d'efflux de la molécule hors de la bactérie. Les supports génétiques de ces différents mécanismes peuvent être le chromosome ou des plasmides dont beaucoup d'entre eux sont transférables entre bactéries. Ces plasmides transférables jouent un grand rôle dans la diffusion de la résistance (Teale, 2002).

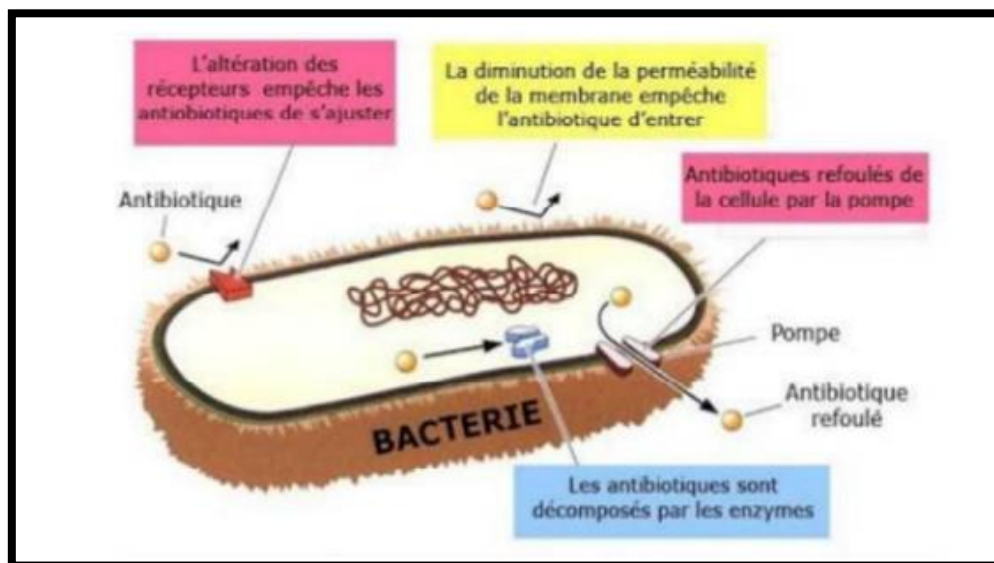


Figure 12: Mécanisme d'action d'antibiorésistance (Teale, 2002).

II.8.3.1.d. les autres risques pour l'homme

Les autres effets dus aux résidus sont d'ordre toxicologique et pharmacologique. On note entre autre une influence sur la flore humaine :

- En modifiant sa composition par inhibition sélective.
- En favorisant ou en sélectionnant des microorganismes résistants. (Scippo, 2008)

Mais il n'y a pas de preuves scientifiques que des concentrations en résidus inférieures aux LMR puissent modifier sérieusement la flore intestinale (Scippo, 2008). Des études *in vivo* sur des modèles animaux visant à évaluer les effets de doses thérapeutiques et de résidus de tétracyclines sur la flore intestinale humaines ont mis en évidence les modifications engendrées sur la flore intestinale. Il y a eu une sélection de bactéries résistantes à la tétracycline, ainsi qu'un effet sur les populations fécales aérobies et anaérobies, sans compter les modifications de certains paramètres métaboliques de la microflore (Châtaigner et Stevens, 2005).

On note aussi une action cancérigène. L'ingestion répétée et prolongée de ces produits peut induire le développement de tumeurs cancéreuses (Châtaigner et Stevens, 2005).

II.8.3.2. Risques pour la santé animale

Les ATB utilisés en thérapeutiques possèdent en règle générale une faible toxicité. Ceci les différencie des antiseptiques externes qui ne peuvent en aucun cas être employés par voie générale. Néanmoins, certains ATB présentent une forte toxicité générale qui empêche leur emploi dans beaucoup d'espèces animales. C'est le cas des ATB ionophores qui présentent une toxicité cardiaque majeure. En dehors des toxicités directes d'organe spécifique à chaque ATB, toute antibiothérapie doit faire craindre au praticien surtout 2 types d'effets indésirables, une perturbation de la flore digestive et des échecs thérapeutiques par sélection de résistance (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

II.8.3.3. Risques d'ordre technologique

La présence d'ATB dans le lait entraîne des accidents de fabrication du fromage, du yaourt et autres produits de fermentation du lait et sa présence dans la viande entraîne des accidents de fabrication du salami et autres produits de fermentation de la viande (Scippo, 2008).

II.8.3.4. Risques pour l'environnement

Il est admis qu'après un traitement d'ATB, les animaux excrètent dans leur environnement une fraction de dose administrée. On constate des disparités dans le temps de demi-vie selon la molécule. Ceci implique une persistance longue de certains ATB dans l'environnement qui peuvent être présents dans les eaux de surface. Cela conduit à une

pollution chimique d'environnement, avec une action sur la flore commensale, d'autant plus que les ATB excrétés sont à doses inférieures aux CMI (Chatellet, 2007).

II.8.4. Délai d'attente

II.8.4.1. Définition

Selon l'article L.617-2 du CSP de la CEE, le temps d'attente est défini comme étant le délai à observer la dernière administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'obtention des denrées alimentaires provenant de cet animal, afin de garantir qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux limites maximales établies par le règlement n°90-2377(CEE) (Milhaud et Pinault, 1999).

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

II.8.4.2. Fixation du temps d'attente

Pour fixer le temps d'attente d'une substance, il faut étudier son métabolisme pour connaître les lieux d'accumulation et les voies d'excrétion du composé de départ et de ses métabolites et étudier leur décroissance en fonction du temps. Ceci nécessite une première investigation avec des molécules marquées, puis de nombreux travaux complémentaires pour les doser. Les différents temps d'attente proposés devront assurer qu'il n'y a pas de résidus mesurables dans les productions d'animal vivant ou dans les denrées alimentaires obtenues après l'abattage (Milhaud, 1978).

II.8.4.3. Modalité de détermination du temps d'attente

Le temps d'attente est calculé en utilisant les résultats des études pharmacocinétiques de déplétion des résidus, réalisées sur un nombre suffisant d'animaux, recommandé par la ligne directrice (Milhaud et Pinault, 1999).

II.8.5. LMR des antibiotiques

II.8.5.1. Définition

Limite maximale de résidus, permet d'établir des seuils acceptables pour les substances contenues dans des médicaments vétérinaires pour toutes les denrées alimentaires d'origines animales. En tenant compte de la toxicité de la substance et de l'exposition possible du consommateur de denrées. Au-delà, la commercialisation de la denrée n'est pas autorisée (Laurentie et Sanders, 2002).

II.8.5.2. Fixation de la LMR

La notion de LMR constitue une synthèse entre les attentes des consommateurs et les contraintes des producteurs permettant, sans interdire l'utilisation des médicaments, leur utilisation en toute sécurité. Cette LMR est calculée en prenant en compte le risque toxicologique et l'effet potentiel des résidus sur la flore digestive d'homme (Fabre *et al.*, 2006).

La fixation de la LMR s'appuie sur 3 notions essentielles :

- Recherche de la dose sans effet sur l'animal par différents tests biologiques.
- Partant de cette DSE et de facteurs de sécurité, calcul d'une Dose Journalière Admissible (DJA).
- Partant de cette DJA, de la connaissance de consommation alimentaire moyenne des habitants et de l'analyse de la répartition dans les différents tissus et organes, on calcule les LMR. (Fabre *et al.*, 2006)

II.8.6. Les résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques

Les résidus d'antibiotiques rejetés dans l'environnement sans être transformés peuvent rester biologiquement actifs et présenter des risques pour l'environnement, d'autant plus qu'ils peuvent se concentrer dans la chaîne alimentaire, ils peuvent influencer les biomasses bactériennes de l'environnement que ce soit dans les eaux, les sols, les stations de traitement des eaux, ou les réseaux de distribution d'eau potable. Quant à la sélection de bactéries antibiorésistantes, elle a été mise en évidence autour d'établissements d'élevage, de fermes, de cliniques. Ce phénomène concerne toutes les eaux (Jean-Marie, 2010).

Des échanges de gènes de résistance peuvent se produire entre les bactéries de l'environnement des fermes piscicoles et les bactéries de l'environnement terrestre, y compris des bactéries pathogènes pour les animaux et pour l'Homme. Des phénomènes d'hépatotoxicité et de génotoxicité se sont exercés sur diverses espèces : poissons, microalgues, crustacés, la cible variant avec l'antibiotique. Sur les écosystèmes terrestres, les antibiotiques peuvent aussi affecter la qualité des sols en perturbant la communauté bactérienne ou en créant des résistances parmi les bactéries environnementales en apportant des bactéries résistantes transmises par les fumiers et les purins, c'est-à-dire créées dans le tube digestif des animaux (Jean-Marie, 2010).

L'eau étant le réceptacle final de bon nombre de nos déchets, la forte consommation d'antibiotiques dans les pays industrialisés, en médecine humaine et vétérinaire, et les rejets d'assainissement conduisent inévitablement à ce que des traces de ces molécules se retrouvent dans les effluents liquides (Yves, 2006).

La détection de résidus d'antibiotiques dans les eaux de surface et l'émergence de souches bactériennes résistantes à certains antibiotiques constituent une nouvelle préoccupation pour les scientifiques et les gestionnaires des ressources en eau (Fatima Tamtam *et al.*, 2009).

La pharmacocinétique des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines indique que ces derniers sont sécrétés majoritairement dans les urines et sous une forme chimique encore active. Cependant, l'hydrolyse chimique rapide du noyau bêta-lactame, caractérisant les antibiotiques de cette famille, rend difficile leur détectabilité dans l'environnement aquatique (Hirsch *et al.*, 1999).

Que se soit sous leur forme native ou sous leur forme dérivée, les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire, de même que les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre l'environnement par le biais des égouts, des stations d'épuration. De même, les produits agrochimiques, comme les fertilisants (produits vétérinaires pouvant contenir des antibiotiques) finissent par être répandus sur les champs par épandage du lisier. Ces substances antimicrobiennes d'origine vétérinaire ou agrochimique sont entraînées avec les pluies, vers les eaux de surface ou les eaux souterraines (Stamm, 2005).

Les organismes résistant aux antibiotiques de l'Homme et d'animaux sont rejetés dans les eaux usées par des sites contaminés (y compris Urine), des excréments,

éventuellement des cadavres et du fumier. En particulier, les eaux usées provenant des hôpitaux et de l'agriculture intensive probablement une source majeure de pathogènes et d'organismes résistant aux antibiotiques et des gènes libérés dans l'environnement (Baquero *et al.*, 2008).

La présence de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques est avérée dans pratiquement tous les types d'eaux, sans qu'il soit facile d'évaluer des tendances claires sur l'aggravation du phénomène ou son association avec les usages d'antibiotiques humains et vétérinaires. Il est évident que les effluents en provenance d'humain ou d'animaux malades et traités aux antibiotiques transportent des bactéries multi résistantes (Yves, 2006).

Chapitre III

Matériels et Méthodes

III.1. Article 01 : Utilisation d'antibiotiques et résidus d'oxytétracycline chez le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus* à Ibadan, Nigeria).

MATERIELS

❖ HPLC Détection et analyse des résidus d'oxytétracycline dans les échantillons de poisson

Appareil HPLC (Agilent, série 1200, fabriqué en Allemagne, produit n° GI3104) connecté à un détecteur UV avec C18 (4.5 x 150 mm, 5µm) comme colonne en phase solide. Le débit a été réglé à 1,3 ml/min alors que la phase mobile était méthanol : acétonitrile : 0,01M acide oxalique dans le rapport 1/1 ; 5/2,5 v/v (Olufemi et Basiru, 2013).

❖ Produits chimiques

Chlorhydrate d'oxytétracycline de qualité laboratoire (étalon de référence) acheté à Sigma chemical Co, St Louis, USA, acétonitrile (qualité HPLC), méthanol (qualité HPLC), acide oxalique, acide chlorhydrique, chlorure de méthylène, éther de pétrole et eau désionisée. Tous les produits chimiques étaient de qualité analytique et ont été correctement dégazés par sonication (Olufemi et Basiru, 2013).

METHODES

III.1.1. Site d'étude

Cette étude a été réalisée à Ibadan, la capitale de l'État d'Oyo, dans le sud-ouest du Nigeria, sur la latitude de référence 07° 22' Nord et la longitude 03° 58' Est. Le choix de la ville pour cette étude est basé sur sa métropole cosmopolite unique avec une grande diversité socio-économique avec des individus à faibles moyens et hauts revenus qui sont des employés du gouvernement, des travailleurs du secteur privé, des artisans, des agriculteurs,..etc. de plus de 2 millions d'habitants (2006, recensement). On y trouve un nombre croissant d'exploitations piscicoles et d'écloseries, ainsi que plusieurs points de vente au détail de poisson frais et prêt à consommer, des marchés aux poissons et des restaurants dans la ville. Des productions de poisson-chat à petite moyenne et grande échelle sont réalisées dans les zones urbaines et périurbaines de la métropole. Des questionnaires et des échantillons de poissons ont été recueillis auprès d'aquaculteurs et de détaillants de la métropole d'Ibadan (Olufemi et Basiru, 2013).

III.1.2. Enquête par questionnaire et collecte d'échantillons

Un questionnaire semi - structuré a été administré au hasard à vingt aquaculteurs pratiquant la pisciculture, sélectionnés au hasard dans six zones de gouvernement local dans la zone péri-urbaine de l'État d'Oyo. Les objectifs généraux de l'étude, à savoir l'efficacité des antibiotiques et la sécurité des résidus, ont été expliqués aux personnes interrogées (Olufemi et Basiru, 2013).

Le questionnaire comprenait des sections sur les caractéristiques socio-démographiques, les exploitations piscicoles, leurs connaissances et leurs pratiques en matière d'utilisation des antibiotiques et de période de sevrage chez leurs poissons, ainsi que leur attitude face à la résistance aux antibiotiques et aux résidus. Un pré-test du questionnaire a été réalisé avec quatre producteurs de poisson-chats pour une meilleure compréhension et une plus grande clarté des questions. Les pratiques d'utilisation des antibiotiques, notamment les indications, la prescription, les sources et l'administration, ont été évaluées. Les connaissances et l'attitude des éleveurs à l'égard des résidus d'antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques ont également été étudiées par le biais des pratiques de respect ou de non respect du délai d'attente, de la vente et de la consommation de poissons sous médicaments récents (Olufemi et Basiru, 2013).

En outre, environ 150 g de 160 échantillons de foie et de muscle ont été obtenus au hasard dans des restaurants de poisson prêt à consommer et des élevages de poisson-chat à Ibadan. Les échantillons ont été recueillis de manière aseptique dans des sacs d'échantillonnage Nasco Whirl - Pak ® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA) et transportés dans une glacière froide au laboratoire du Département de la santé publique vétérinaire et de la médecine préventive, stockés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction et de l'analyse des résidus (Olufemi et Basiru, 2013).

III.1.3. Dépistage des résidus d'antimicrobiens

Environ 2 cm³ de chaque foie et filet ont été coupés dans la presse à viande pour extraire le jus de viande dans un plat de Pétri. A l'aide d'une micropipette, 100 µl ont été soigneusement aspirés sur chaque ampoule de gélose pré-gélatinisée. L'agar avec l'extrait a été laissé au repos pendant 20 minutes pour la pré-diffusion à température ambiante, puis rincé soigneusement à deux reprises avec de l'eau distillée. L'agar est ensuite égoutté de l'extrait, puis les ampoules sont fermées à l'aide d'une feuille d'aluminium. Celles-ci ont été

incubées dans le bloc chauffant pendant 3 heures à 64°C. Les résultats ont été observés à l'aide d'un indicateur de changement de couleur dans la gélose (Olufemi et Basiru, 2013).

III.1.4. Préparation de la courbe standard

La courbe d'étalonnage (fig 13) a été préparée à partir des surfaces de pic obtenues en injectant la concentration correspondante de solutions étalons d'oxytétracycline de 10,0 ; 5,0 ; 2,5 ; 1,0 ; 0,5 et 0,25 ppm dans des fioles jaugées de 10 ml. L'équation linéaire obtenue $y=19,598x + 6,6594$ a été obtenue où y =surface du pic et x = concentration de l'oxytétracycline (ppm) et le coefficient de corrélation (r^2) = 0,9955 montrant la linéarité (Fig 13). La limite de détection de l'oxytétracycline était de 0,01 ppm, tandis que le temps de rétention moyen de l'oxytétracycline était d'environ 2,8 à 3,5 minutes (Olufemi et Basiru, 2013).

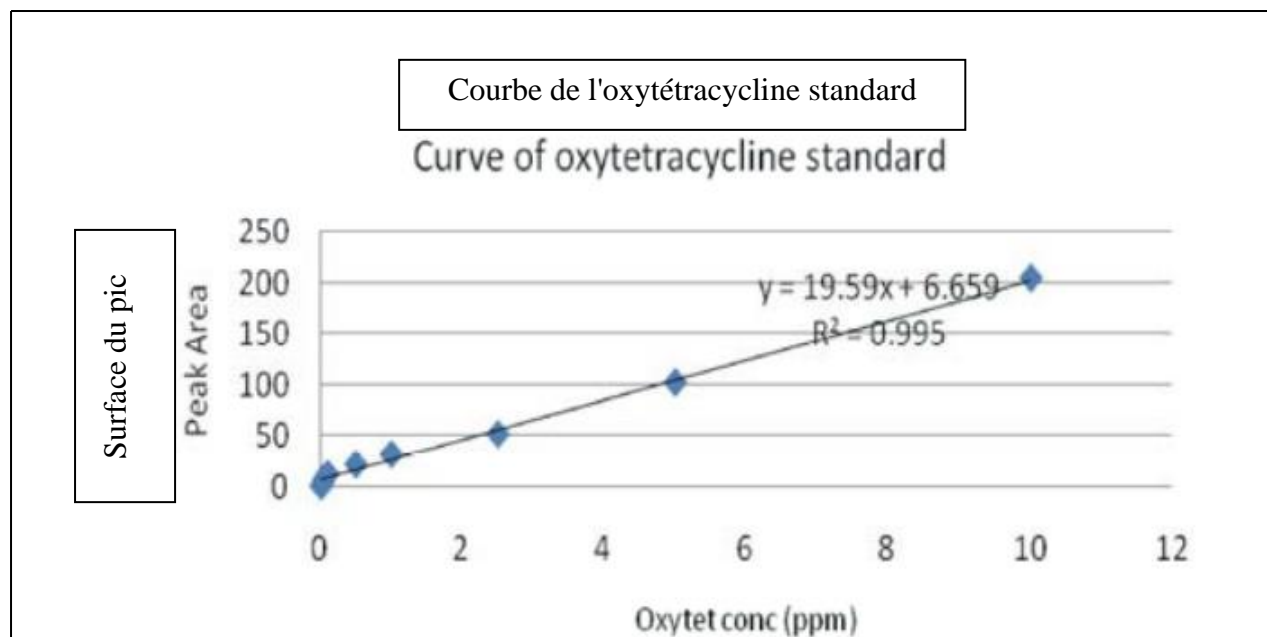


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la solution étalon d'oxytétracycline (Olufemi et Basiru, 2013).

III.1.5. Préparation de l'échantillon

Des procédures d'extraction par partage liquide-liquide ainsi que de nettoyage ont été utilisées pour obtenir l'analyte. 25 g de chaque échantillon ont été homogénéisés et déprotéinisés avec 3 volumes d'acide chlorhydrique IN, après quoi 8 ml de l'homogénat ont été soigneusement mélangés avec 32 ml d'acétonitrile et laissés au repos pendant 5 minutes.

Le surnageant a été décanté à travers une laine de verre sur la tige d'un entonnoir en verre et 20 ml du filtrat ont été vigoureusement agités avec 20 ml d'éther de pétrole et 20 ml de chlorure de méthylène dans une ampoule à décanter. La couche aqueuse contenant l'analyte a été recueillie pour l'analyse HPLC (Olufemi et Basiru, 2013).

III.1.6. Analyse HPLC des résidus d'oxytétracycline

Détection et quantification par HPLC selon Muriuki *et al* (2001) ont été utilisées. L'oxytétracycline a été quantifiée pour les résidus d'oxytétracycline en utilisant un appareil HPLC équipé d'une pompe à débit constant et d'un détecteur U.V. à longueur d'onde variable réglé à 280 nm et un débit de 2 ml/min. L'élution de l'oxytétracycline de l'analyte a été effectuée sur une colonne de nucléosil C18 (4,5x150 mm, 5µm ID) avec une solution aqueuse de méthanol - acétonitrile - 0,01 M d'acide oxalique (1/1,5/2,5) à un pH de 2,0 comme phase mobile. Un volume d'injection de 20 µl des analytes de chaque échantillon a été injecté en double pour obtenir la surface moyenne des pics de l'échantillon positif correspondant au temps de rétention de 2,8 à 3,5 minutes de l'étalon de référence. Les concentrations de résidus d'oxytétracycline dans les échantillons ont été calculées à partir de l'équation linéaire obtenue à partir de courbe étalon (Olufemi et Basiru, 2013).

III.1.7. Expérience de récupération

La validation du protocole par l'expérience de récupération et la précision ont été déterminées en utilisant l'écart type relatif (ETR) et le pourcentage de récupération. Quatre répliques de poissons exempts d'oxytétracycline dopés avec des concentrations différentes d'oxytétracycline standard ont été soumises aux procédures d'extraction, de nettoyage et de HPLC pour valider nos méthodes et nos résultats (Olufemi et Basiru, 2013).

III.2. Article 02 : Détermination de l'amoxicilline dans les tissus de poisson-chat et de saumon par chromatographie liquide avec dérivatisation précolonne de formaldéhyde.

MATERIELS

❖ Réactifs

Les réactifs pour l'analyse de la CL étaient de qualité CL. Les autres produits chimiques et réactifs étaient de qualité analytique ACS ou de la plus haute pureté disponible. L'eau était déionisée (18 MQ/cm) et passait à travers un filtre à charbon (système de

purification de l'eau Milli-Q, Waters, Milford, MA). Des réactifs à blanc ont été contrôlés pour confirmer l'absence de pics parasites (Ang *et al.*, 1996).

a) Solutions étalons : Le trihydrate d'amoxicilline étalon de référence (contenant 861 Hg/mg d'amoxicilline) a été obtenu à partir de la convention de la pharmacopée américaine (Rockville, MD). Préparer une solution mère d'amoxicilline de 1 mg/ml dans de l'eau en pesant 11,61 mg d'étalon de référence et en le dissolvant dans 10 ml d'eau. Cette solution est stable jusqu'à 1 mois si elle est conservée dans l'obscurité à 4°C. Préparer une solution étalon intermédiaire en diluant la solution mère à 5 µg/ml avec de l'eau. Conserver au réfrigérateur jusqu'à 1 semaine. Préparez quotidiennement des solutions étalons de travail de 50 et 100 ng/ml en diluant la solution étalon intermédiaire dans de l'eau (Ang *et al.*, 1996).

b) Solution tampon de phosphate (0,01 M) : Dissoudre 1,36 g de KH₂P₀₄ dans 1 L d'eau et ajuster le pH à 4,5 selon les besoins. Préparer des solutions de TCA dans l'eau à 2, 20 et 75% (p/v) (Ang *et al.*, 1996).

c) Solution de formaldéhyde : Préparer une solution de formaldéhyde à 7 % (p/v) en diluant du formaldéhyde concentré (37 %) avec de l'acide citrique 0,4 M (Ang *et al.*, 1996).

d) CL phase mobile : Préparer une solution de KH₂P₀₄ à 0,05 M (6,8 g/L) et ajuster le pH à 5,6 avec de l'hydroxyde de potassium. Mélanger 800 ml de solution tampon avec 200 ml d'acétonitrile, filtrer à travers une membrane filtrante de 0,45 µm et dégazer (Ang *et al.*, 1996).

e) Échantillons de poisson : Les filets de poisson-chat sans peau et les filets de saumon avec peau, conditionnés sous glace, ont été achetés auprès d'un marché local producteur de fruits de mer. Les échantillons ont été emballés dans des sacs de congélation et conservés à -70°C jusqu'à leur analyse (Ang *et al.*, 1996).

❖ Appareil

- Robot de cuisine, modèle 702 R (Hamilton Beach/ Proctor-Silex, Washington, NC) ou équivalent.
- Homogénéisateur de tissus, modèle Ultra-Turrax T25 (IkaLabortechnik, Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne) ou équivalent.
- Centrifugeuse - Modèle CEI réfrigéré PR-J ou équivalent.
- Mélangeur à vortex.
- Système d'extraction en phase solide - Collecteur sous vide ; cartouches Sep-Pak Vac 3 cc C18 contenant 500 mg de sorbant (Waters, Milford, MA) ou équivalent.
- Évaporateur : évaporateur (Organomation, South Berlin, MA) ou équivalent.

- Pompe du système CL, modèle 600E (Waters), ou équivalent ; injecteur, modèle 7125 (Rheodyne, Cotati, CA) avec boucles à volume fixe, ou équivalent ; détecteur, modèle 470 détecteur de fluorescence à balayage (Waters) ; logiciel de traitement des données et de surveillance du système, Millennium 2010 Chromatogram Manager (Waters), ou équivalent. Colonne, Spherisorb S5 ODS2, 25 cm x 4,6 mm (Séparations de phases, Norwalk, CT), ou équivalent.
- Bain-marie - Pour maintenir la température entre la température ambiante et $100^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Buchi Model 481, Brinkmann Instrument, Westbury, NY), ou équivalent. (Ang *et al.*, 1996)

METHODES

III.2.1. Préparation et extraction des échantillons

Coupez les filets de poisson-chat sans peau en petits morceaux (environ 2 x 2 cm). Pour les échantillons de saumon, séparez d'abord la peau du tissu musculaire, puis coupez le tissu musculaire en petits morceaux (environ 2 x 2 cm). Mélangez une portion de 200 g de tissu musculaire (poisson-chat ou saumon) dans un robot ménager pour obtenir une consistance pâteuse uniforme. Peser 5 g de tissu mélangé dans un tube à centrifuger en polypropylène de 50 ml. Ajouter 20 ml de solution tampon au phosphate 0,01M (pH 4,5). À l'aide d'un homogénéisateur de tissus, homogénéiser le mélange à 10 000 tr/min pendant 90 s. Centrifuger 10 min à 4 500 tr/min et décanter le surnageant dans un autre tube à centrifuger de 50 ml. Homogénéiser le résidu avec une autre solution tampon de 20 ml, centrifuger comme précédemment, et combiner le surnageant avec le premier extrait. Filtrer à travers un bouchon de laine de verre. Le volume total du filtrat est d'environ 40 ml. Pour la déprotéinisation, ajouter 1 mL de solution de TCA à 75% au filtrat et mélanger 30 s sur le mélangeur Vortex. Centrifuger 20 min à 4500 tr/min et filtrer le surnageant à travers un bouchon de laine de verre (Ang *et al.*, 1996).

III.2.2. Extraction et concentration en phase solide

Fixez la cartouche d'extraction en phase solide C18 au collecteur à vide. Conditionner chaque cartouche avec 5 ml de méthanol. Laver les cartouches avec 2 ml d'eau et 2 ml de solution de TCA à 2 %. Appliquer le filtrat de l'échantillon sur la cartouche et ajuster le débit à environ 12 ml/min. Après le passage de tout le filtrat, laver la cartouche avec 2 ml de TCA à 2%, attendre que toute la solution de TCA passe dans la cartouche, puis laver

la cartouche avec 2 ml d'eau. Jeter tout l'effluent collecté. Appliquer 1,5 ml d'acétonitrile sur la cartouche et contrôler le débit à environ 0,7 ml/min. Recueillir l'éluat dans un tube à culture de 15 ml à bouchon vissant en verre. Ajouter 0,5 ml d'eau et 3 ml d'éthyl éther, agiter doucement sur le mélangeur Vortex pendant 30 s, et centrifuger 3 min à 2000 rpm. Enlever la plus grande partie de la couche supérieure (éther) par aspiration et la jeter. Ne pas enlever complètement la couche supérieure pour éviter la perte de la phase aqueuse (Ang *et al.*, 1996).

III.2.3. Dérivatisation et extraction

Ajouter 0,2 ml de solution de TCA à 20% dans la phase aqueuse du tube de culture et agiter sur le mélangeur Vortex pendant 15 s. Ajouter 0,2 ml de solution de formaldéhyde et agiter sur le mélangeur Vortex pendant 30 s. Chauffer au bain-marie bouillant pendant 30 min, puis refroidir à température ambiante. Ajouter environ 0,5 g de chlorure de sodium dans chaque tube et mélanger brièvement. Extraire le dérivé d'amoxicilline fluorescent du mélange réactionnel avec 3 ml d'éther éthylique 3 fois. Agiter sur le mélangeur Vortex pendant 1 min, centrifuger pendant 3 min à 2000 tr/min, et enlever la couche d'éther à chaque fois avec une pipette Pasteur. Combiner les extraits d'éther dans un tube de verre de 15 ml et évaporer le contenu du tube à sec sous un courant d'azote dans une N-Evap avec bain-marie réglé à 40°C. Reconstituer en ajoutant 0,5 ml de phase mobile dans chaque tube et agiter sur le mélangeur Vortex (Ang *et al.*, 1996).

III.2.4. Dérivatisation des solutions étalons

Pour établir la courbe d'étalonnage, préparer des solutions étalons de travail en diluant la solution étalon intermédiaire dans l'eau à des concentrations de 0, 10, 25, 50, 100, 250, et 500ng/ml. Pipeter 1 ml de chacune de ces solutions étalons en double dans des tubes à centrifuger en verre de 15 ml. Suivre la procédure décrite précédemment pour la dérivation et l'extraction (Ang *et al.*, 1996).

III.2.5. Analyse CL et quantification

Injecter 50 µl dans le système CL à un débit initial de 1 ml/min. Augmenter le débit à 2 ml après 10 min pour faciliter l'élution des composés interférents à élution tardive. Surveiller la réponse du pic de fluorescence avec la longueur d'onde d'excitation à 358 nm et l'émission à 440 nm. Au cours des opérations de routine, des aliquotes de 1 ml de solution étalon de travail (50 ng/ml) sont dérivées et analysées quotidiennement avec des échantillons

pour étalonnage. L'amoxicilline est quantifiée par une méthode standard externe. Les valeurs sont corrigées pour une dilution appropriée et calculées en nanogramme par gramme (ppb) de tissu de poisson (Ang *et al.*, 1996).

III.2.6. Récupération à partir d'échantillons dopés

Pour déterminer la récupération des étalons à partir d'échantillons dopés, ajouter 125, 250, 500 et 1000 μL de solutions étalons de travail de 100 ng/ml à 5 g de tissu de poisson pour obtenir des concentrations finales de 2,5, 5, 10 et 20 ng/g, respectivement. Laissez les échantillons dopés s'équilibrer à température ambiante pendant 30 à 60 minutes avant de les homogénéiser. Ensuite, traiter et analyser les échantillons dopés comme décrit précédemment. Pour les déterminations de variation intra-journalière, 5 à 7 échantillons dopés au même niveau de concentration et un échantillon témoin sont analysés en une seule fois. Cependant, pour les déterminations de variation au jour le jour, les échantillons dopés à différents niveaux et le contrôle sont analysés en une journée et l'opération est répétée pendant 5-7 jours (Ang *et al.*, 1996).

III.2.7. Identification des dérivés fluorescents

Pour identifier positivement le dérivé fluorescent de l'amoxicilline, on a fait réagir une aliquote de 1 ml de solution mère standard d'amoxicilline pour produire le dérivé. Le composé a ensuite été isolé et recueilli à l'aide d'un système de CL semi-préparatif composé d'une colonne C18 de 25 cm x 10 mm de diamètre intérieur, 5 μm (colonne Ultrasphere-ODS, Beckman Instruments/Altex Scientific Operations, Berkeley, CA) et d'une phase mobile de 80% de formiate d'ammonium (0,05M, pH 5,8) avec 20% d'acétonitrile. La phase mobile a été pompée à 4 ml/min par une pompe de modèle 100A (Beckman Instruments/Altex Scientific Operations), et l'éluat a été contrôlé à 254 nm. Le pic recueilli (temps de rétention, 11,3 min) a été évaporé à sec dans un bain-marie à 40°C sous un courant d'azote, dissous dans l'eau, et passé dans une cartouche d'extraction en phase solide C18. La cartouche C18 a été lavée deux fois avec des aliquotes de 5 ml d'eau, et le dérivé a été élué avec 2 ml de méthanol. Le méthanol a été évaporé à sec et le dérivé a été analysé par spectroscopie de masse et par résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons. L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée avec un spectromètre de masse quadripolaire Finnigan MAT (Finnigan MAT Corp., San Jose, CA) qui a été mis à niveau avec les capacités du Finnigan 4500. L'instrument a fonctionné en mode d'ionisation électronique avec une énergie électronique de 70 V. La

température de la source d'ions était de 150°C, et le quadripôle a balayé de 50 à 650 daltons en 1 s (Ang *et al.*, 1996).

L'échantillon a été introduit par la sonde d'exposition directe (DEP) de Finnigan, et les données ont été recueillies alors que le courant de la DEP augmentait linéairement de 0 à 650 mA à 5 mA/s. Les spectres RMN des protons ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AM500 (Bruker Instrument, Billerica, MA) fonctionnant à 500,13 MHz. Les décalages chimiques (ppm) ont été déterminés après avoir attribué le signal protonique résiduel du solvant, l'acétone-d₆, à 2,04 ppm. Les paramètres d'acquisition étaient les suivants: température, 29°C ; largeur de balayage, 7042 Hz ; largeur d'impulsion, 90° ; taille des données, 32K ; délai de relaxation, 0 s ; et temps d'acquisition, 2,33 s. Le nombre de balayages variait de 200 à 296. Les données ont été traitées avec une amélioration de la résolution grâce à une fonction de fenêtre gaussienne : LB = -0,5 ; GB = 0,17. Pour la mesure des constantes de couplage, la décroissance de l'induction libre a été remplie jusqu'à 64K, suivie d'une amélioration de la résolution en utilisant un domaine temporel effectif de 64K, ce qui a donné une résolution finale des points de données de 0,215 Hz par point (Ang *et al.*, 1996).

III.3. Article 03 : Validation primaire des tests Charm II pour la détection des résidus d'antimicrobiens dans une série de poissons d'aquaculture.

MATERIELS

❖ Réactifs, matériel et équipement

Le kit de test antimicrobien a été obtenu auprès de Charm Sciences Inc, Lawrence, MA ; et a inclus des éléments pour la détection des bêta-lactames (PMSU-050A) ; sulfonamides (SMMSU-022C), macrolides (EMSU-023A) ; tétracyclines (TMSU-025) ; et la streptomycine (STMSU-023A) (Mukota *et al.*, 2020).

❖ Consommables et équipements utilisés pour les tests inclus

Tampon M2, étalons de contrôle positif et zéro, tampon d'extraction MSU, comprimés marqués radioactifs ; combustible de scintillation (Opti-Fluor O, PerkinElmer), incubateur intronique (Charm Sciences Inc.), compteur de scintillateurs Wallac 1409, centrifugeuse réfrigérée Sigma 4K15c (Sigma-Aldrich), mélangeur R2 (Robot-Coupe) et un bain marie (Julabo MB13). En outre, des flacons à scintillation, un stomacher de masticage

AES mix et la centrifugeuse IEC Centra CL-3 ont également été utilisés (Mukota *et al.*, 2020).

METHODES

L'étude a effectuée une validation primaire des tests de la méthode Charm II pour la détection des résidus d'antimicrobiens dans les déchets d'aquaculture. La validation des tests a été effectuée conformément à la décision 2002/657/CE de la Commission (ECD, 2002). Et toutes les méthodes d'analyse utilisées ont été adoptées à partir des protocoles généraux du Charme II (Charm Sciences, 2014).

III.3.1. Préparation du matériel de référence et du stock standard solutions

Le standard de concentré multi-microbien (MSU, Charm Sciences Inc.) a été préparé fraîchement le jour d'utiliser et diluer avec 10 ml d'eau déionisée, agiter bien et qu'on les laisse reposer sur la glace pendant 15 minutes. La solution mère reconstituée contient de la pénicilline G, 1000 µg/kg ; érythromycine A, 10 000 µg/kg ; sulfaméthazine, 1 000 µg/kg ; la chlortétracycline, 4000 µg/kg ; et la streptomycine, 10 000 µg/kg. D'autres étalons analytiques ont été achetés de Sigma Aldrich, Pfizer Inc, US Pharmacopeia Convention et Acros Organics (Mukota *et al.*, 2020).

Ces étalons ont été dilués de manière appropriée avec de l'eau déionisée pour faire des solutions étalons de travail de l'antimicrobienne respective, et maintenu à une température inférieure à 4 °C. Des normes de travail ont été utilisées pour l'enrichissement des échantillons d'eaux usées à différents niveaux de concentration allant de 25 à 300 µg/kg (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.2. Échantillons de poissons sélectionnés pour l'étude

Les matériaux de poisson utilisés dans l'étude ont été obtenus à partir de poissons morts achetés dans les poissonneries de Melle et de Gand et des supermarchés en Belgique. Des espèces de poissons d'aquaculture, dont le poisson-chat (Siluriformes), la truite (*Oncorhynchus mykiss*), le saumon (*Salmo salar*), le bar (*Dicentrarchus labrax*), le tilapia (*Oreochromis niloticus*), la lingue (*Molva molva*), la dorade (*Sparus aurata*) et le pangasius (*Pangasius bocourti*), ont été sélectionnées pour l'étude. Les matériaux des échantillons de poissons ont été prélevés en enlevant soigneusement le tissu musculaire sur le côté de chaque poisson en prenant la précaution d'exclure les écailles et la peau. Les échantillons de poissons

qui n'ont pas été utilisés immédiatement ont été stockés à une température inférieure à -18 °C pour une durée maximale de 2 mois (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.3. Préparation des échantillons

L'échantillon de poisson frais a été pesé dans un tube à centrifuger et stocker à -18 °C jusqu'à leur transformation ultérieure. Les échantillons de poisson congelés ont été décongelés à 4 °C pendant la nuit et découpés en petits morceaux avant de les mélanger dans un mélangeur à grande vitesse. Le mélange de matières premières (10 g) a été transféré dans un tube de centrifugeuse en polypropylène et utilisé immédiatement (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.4. Préparation des échantillons de contrôle

Tous les échantillons de poissons ont d'abord été testés avec les différents kits Charm II et n'ont été utilisés que si aucun résidu de médicament vétérinaire n'était détecté. Absence d'antibiotiques résiduels dans les échantillons de poissons a été confirmée par l'évaluation de leurs comptes par minute par rapport aux résultats obtenus à l'aide des tampons d'extraction du contrôle négatif fournis avec les kits Charm II. Les tampons de contrôle sont utilisés pour qualifier la matrice comme négatif lorsqu'un négatif connu n'est pas disponible. La tolérance considérée pour que la matrice de poisson puisse être qualifiée de négatif et sélectionnée pour être utilisée dans un test ultérieur était pour compte à $\pm 20\%$ près du résultat moyen obtenu avec le tampon d'extraction du témoin négatif respectif. Les échantillons dont le nombre dépasse les limites de tolérance ont été rejetés, tandis que ceux qui répondaient aux critères ont été sélectionnés pour l'étude. Les matériaux de poissons vierges sélectionnés après ont été dopés avec des normes antimicrobiennes de concentrations connues et utilisées comme échantillons de contrôle pour l'établissement du comptage des points de contrôle par minute (CPM) (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.5. Extraction de médicaments à partir des matières premières du poisson

Le tampon d'extraction MSU (30 ml) a été ajouté au mélange du poisson (10 g) dans un tube centrifugeur en polypropylène. Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un stomacher pour 2 min et retour au tube à centrifuger. L'homogénat a été incubé dans un bain-marie à 80°C pendant 30 minutes, lors du dosage de la streptomycine, des macrolides, ou bêta-lactames ; et 45 min, lors de la détermination des tétracyclines ou des sulfamides. Après incubation, le tube a été refroidi sur de l'eau glacée pendant 10 minutes, puis centrifugé à

3300 tours/minute pendant 10 minutes, en utilisant une centrifugeuse réfrigérée 4K15C (Sigma-Aldrich). La solution surnageante ainsi obtenue a été recueillie et utilisée pour les tests requis. Le pH du surnageant a été ajusté à pH 7,5 en utilisant le tampon M2 du kit Charm II reconstitué pour faible pH, ou 0,1 M d'acide chlorhydrique pour un pH élevé (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.6. Détermination des tétracyclines dans les échantillons de poissons

Dans la détection de la tétracycline, le comprimé blanc de la trousse contenant le réactif de liaison (TMSU-025) a été introduit dans une éprouvette, et l'eau (300 µl) a été ajoutée. Le contenu du tube a été mélangé pendant au moins 10 s pour assurer la rupture de la tablette. L'extrait de l'échantillon ou l'échantillon témoin (4 ml) a été ajouté au tube, puis par addition du comprimé orange contenant le traceur réactif du kit (TMSU-025). La solution résultante a été mélangée pendant environ 10 s et le mélange a été incubé à 35 °C pendant 5 min ; puis centrifugé pendant une autre 5 min sur une centrifugeuse IEC Centra CL-3. Le surnageant a été versé avec précaution, empêchant le culot formé de glisser hors du tube à essai. Eau déionisée (300 µl) a été ajoutée au tube et le contenu s'est mélangé à fond pour briser la boulette. Après la mise en suspension du culot dans l'eau, le liquide de scintillation (3,0 ml) a été ajouté et le test tube bouché. Le tube a été secoué jusqu'à ce que le mélange ait un aspect nuageux uniforme. Le contenu du tube de verre a été transféré complètement dans un flacon à scintillation et le mélange a été compté à l'aide d'un scintillateur liquide Wallac compteur pendant 60 s sur le canal [³H]. Les résultats de l'échantillon ont été comparés avec le nombre de points de contrôle par minute (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.7. Détermination des macrolides dans les échantillons de poissons

Lors de la détection des macrolides, la tablette blanche de kit Charm II contenant le réactif de liaison (EMSU-023A) a été introduite dans un tube à essai, et de l'eau (300 µl) a été ajoutée. Le contenu du tube a été mélangé pour au moins 10 s pour assurer la rupture de la tablette. L'extrait de l'échantillon ou l'échantillon de contrôle (4 ml) a été ajouté au tube et le contenu a été mélangé dans un vortex pendant 10 s. Le résultat a été incubé à 55°C pendant 2 min, puis on a ajouté un comprimé vert contenant le réactif de traçage de kit (EMSU-023A). Le résultat a été mélangé sur un pendant 10 s. Le mélange a été incubé à 55 °C pendant 2 min, puis centrifugé pendant 5 min. Le surnageant a été versé avec précaution et le bord du tube a été bombé sur papier absorbant. L'eau déionisée (300 µl) a été ajoutée au tube et le contenu

s'est mélangé à fond pour se briser la boulette formée. Après mis en suspension du granulé dans l'eau, le liquide de scintillation (3,0 ml) a été ajouté et le tube à essai bouché. Le contenu a été mélangé dans un vortex jusqu'à ce que le mélange ait un aspect nuageux uniforme. Le contenu du tube de verre a été entièrement transféré dans un flacon à scintillation et le mélange a été compté à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Wallac pendant 60 s sur le canal [^{14}C]. Les comptages par minute (CPM) de l'échantillon ont été comparés avec le point de contrôle (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.8. Détermination des sulfamides dans les échantillons de poissons

Dans la détection des sulfamides, le comprimé blanc de kit Charm II contenant le réactif de liaison (SMMSU-022C) a été introduit dans un tube à essai, et l'eau (300 μl) ajoutée. Le contenu du tube a été mélangé pendant au moins 10 s pour assurer la rupture de la tablette. L'extrait de l'échantillon ou l'échantillon témoin (4 ml) a été ajouté au tube, puis par addition de la pastille rose contenant le réactif de traçage (SMMSU-022C) du kit. La solution résultante a été mélangée en faisant tourbillonner le contenu de haut en bas pendant environ 15 s. Le mélange a été incubé à 65 °C pendant 3 min, puis centrifugé pendant 3 minutes supplémentaires. Le surnageant a été versé avec précaution, ce qui a empêché le granulé formé de glisser hors du tube à essai ; et le bord du tube a été effacé sur du papier absorbant. De l'eau déionisée (300 μl) a été ajoutée au tube et le contenu s'est mélangé minutieusement pour se briser de la boulette. Après mise en suspension du granulé dans l'eau, le liquide de scintillation (3,0 ml) a été ajouté et le tube à essai a été bouché. Le tube a été secoué jusqu'à ce que le mélange ait un aspect trouble uniforme. Le contenu du tube de verre était transféré complètement dans un flacon à scintillation et le mélange est compté à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Wallac pendant 60 s sur le canal [^3H]. Les résultats de le CPM de la chaîne ont été comparés avec le point de contrôle (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.9. Détermination de l'aminoglycoside-streptomycine dans le poisson échantillons

Dans le dosage de la streptomycine, le comprimé blanc du kit contenant le réactif de liaison (STMSU-023A) a été introduit dans un tube à essai, et de l'eau (300 μl) a été ajoutée. Le contenu du tube a été mélangé pendant au moins 10 s pour assurer la rupture de la tablette. L'extrait d'échantillon ou l'échantillon témoin (2 ml) a été ajouté au tube et mélangé. On a ensuite ajouté la pastille verte contenant le réactif de traçage (STMSU-023A). Le résultat a été mélangé en faisant tourbillonner le contenu de haut en bas pendant environ 10 s. Le mélange a

été incubé à 35 °C pendant 2 min, et puis centrifugé pendant 3 minutes supplémentaires. Le surnageant était versé avec précaution et le bord du tube a été tamponné avec papier absorbant. L'eau déionisée (300 µl) a été ajoutée au tube et le contenu s'est bien mélangé. Après la mise en suspension du granulé dans l'eau, le liquide de scintillation (3,0 ml) a été ajouté et le tube à essai a été bouché. Le tube a été agité jusqu'à ce que le mélange ait un aspect nuageux uniforme. Le contenu du tube de verre a été entièrement transféré dans un flacon à scintillation et le mélange a été compté en utilisant un compteur à scintillation liquide Wallac pendant 60 s sur le canal [³H]. Les résultats de le CPM pour l'échantillon ont été comparés avec le point de contrôle (Mukota *et al.*, 2020).

III.3.10. Détermination des β-lactames dans les échantillons de poissons

Dans la détermination des β-lactames, la tablette verte du kit Charm II contenant le réactif de liaison (PMSU-050A) a été introduit dans un tube à essai, et de l'eau (300 µl) a été ajoutée. Le contenu du tube a été mélangé pour assurer la rupture de la tablette. L'extrait d'échantillon ou le contrôle (2 ml) a été ajouté au tube et le contenu a été mélangé sur un vortex pendant 10 s. Le résultat a été incubé à 55 °C pendant 2 minutes, puis ajout d'un comprimé jaune contenant le réactif de traçage (PMSU-050A) du kit. Le résultat a été mélangé sur un vortex pendant 10 s. Le mélange a été incubé à 55 °C pendant 2 minutes, puis centrifugé pendant 5 min à 1750 G. Le surnageant a été versé avec précaution et le bord du tube a été tamponné sur du papier absorbant. De l'eau déionisée (300 µl) a été ajoutée au tube et le contenu est mélangé à fond pour briser la boulette. Après la suspension du granulé dans l'eau, le liquide de scintillation (3,0 ml) a été ajouté et le tube à essai a été bouché. Le contenu a été mélangé dans un vortex jusqu'à ce que le mélange ait un aspect trouble. Le mélange a été complètement transféré dans un flacon à scintillation et compté à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Wallac pendant 60 s sur le canal [¹⁴C]. Le CPM de l'échantillon a été comparé avec celui du témoin point (Mukota *et al.*, 2020).

Chapitre IV

Résultats et Discussion

IV.1. Article 01

RESULTATS

IV.1.1. Caractéristiques et fonctionnement des éleveurs de poissons-chats

Sur les 20 éleveurs de poissons-chats interrogés, la majorité (75 %) étaient des hommes, tandis que 25 % étaient des femmes, avec un âge moyen et une expérience de la production de poisson de 48 ans et 6,5 ans respectivement. Leur niveau d'éducation va du certificat d'école primaire au diplôme universitaire, dont deux vétérinaires. Toutes les personnes interrogées ont produit du poisson à des fins commerciales et pour la consommation domestique. La densité moyenne d'élevage était de 15 000 poissons, dont 10 % de grands producteurs utilisant un système moderne de circulation de l'eau et les autres dans des étangs en terre (Olufemi et Basiru, 2013).

IV.1.2. Utilisation de médicaments dans la production aquacole

La majorité (90 %) des pisciculteurs interrogés ont pratiqué l'administration systématique d'antibiotiques pour prévenir les maladies des poissons. Des préparations d'antibiotiques pour l'homme ont également été utilisées de manière systématique. Environ 65 % des éleveurs ont déclaré administrer des médicaments de façon routinière pour prévenir l'apparition de maladies ou les pertes de mortalité sans faire appel aux services de vétérinaires pour le diagnostic et le traitement des maladies. La majorité des personnes interrogées se sont plaintes de l'absence ou de la non-disponibilité de vétérinaires spécialistes des poissons. Toutes les personnes interrogées (100 %) ont déclaré qu'elles administraient régulièrement plusieurs antibiotiques, tels que l'oxytétracycline, la pénicilline G procaïne, la verte malachite et l'enrofloxacin, à leurs stocks de poissons pour la prévention des maladies, le traitement et la productivité. L'oxytétracycline était l'antibiotique le plus fréquemment administré aux stocks de poissons et aux aliments pour poissons par 73 % des personnes interrogées. Environ 85,5% des personnes interrogées ne connaissaient ni le délai d'attente pour les antibiotiques ni les dangers potentiels des résidus d'antibiotiques dans les aliments pour animaux (Olufemi et Basiru, 2013).

IV.1.3. Courbe standard de l'oxytétracycline et résultats de la récupération

La courbe d'étalonnage obtenue à partir de l'oxytétracycline standard est représentée sur la figure 2 avec l'équation linéaire $y = 19,598x + 6,6594$ où y = surface du pic (cm²) et

x = concentration de l'oxytétracycline (ppm) et le coefficient de corrélation (r^2) = 0,9955 indiquant la linéarité. La limite de détection de l'oxytétracycline était de 0,01 ppm, tandis que le temps de rétention moyen de l'oxytétracycline était d'environ 2,3 à 3,2 minutes. La figure 2 montre les échantillons des chromatographes. Les valeurs moyennes de récupération de l'oxytétracycline injectée dans les poissons variaient entre 85,2 % et 88,5 %, tandis que l'écart-type relatif (ETR) était compris entre 1,43 et 2,38 % (tableau 2). Ces résultats montrent une bonne linéarité et reproductibilité ($R^2 = 0,993$). La LOD et la LOQ étaient respectivement de 10,0 et 32,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tandis que les coefficients de variation (CV) des solutions étalons dopées se situaient entre 1,2 % et 2,4 %, et pour les échantillons, entre 0,02% et 0,4% (Olufemi et Basiru, 2013).

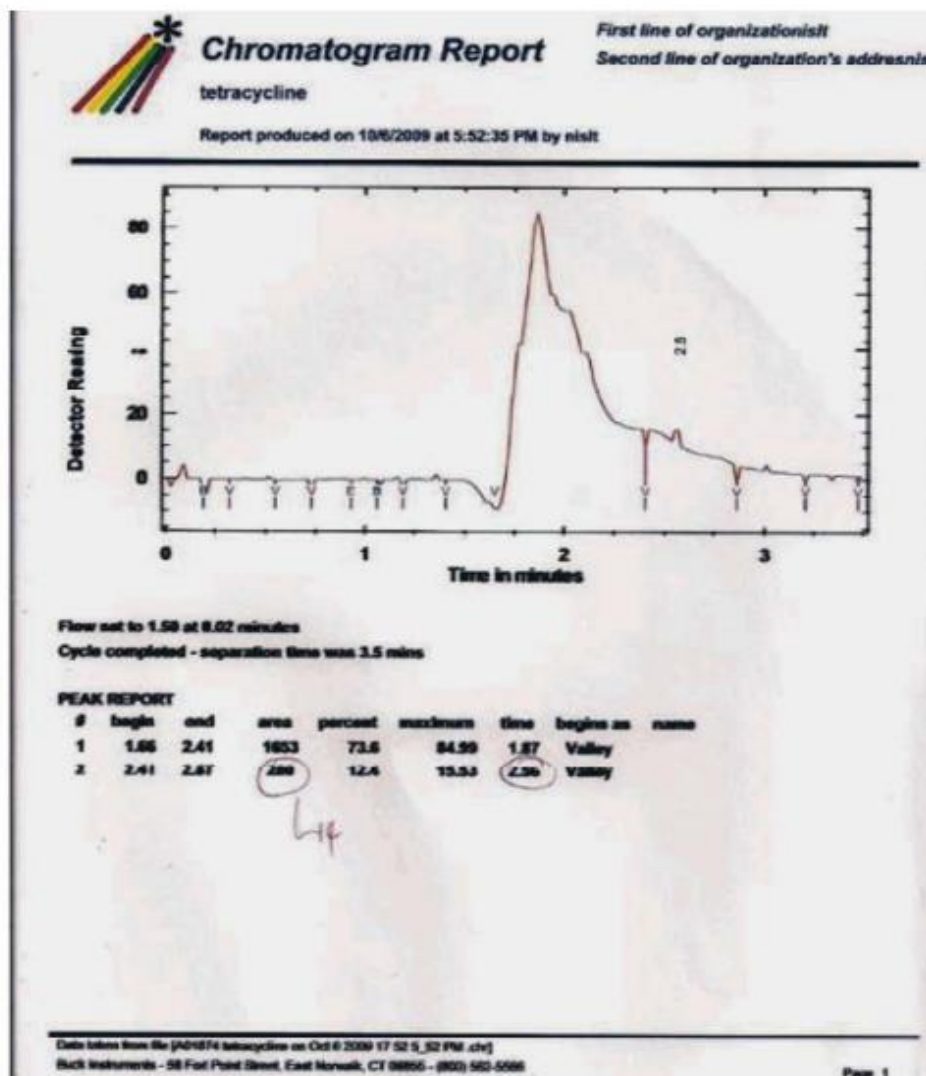


Figure 14 : Chromatogramme du résidu d'oxytétracycline dans un échantillon de foie de poisson-chat (Olufemi et Basiru, 2013).

IV.1.4. Prévalence des résidus d'antibiotiques dans les poissons

La prévalence globale des résidus d'antibiotiques chez les poissons-chats utilisant le test Premi ® était de 61,3 % dans les échantillons de foie et de 52,5 % dans les échantillons de filets, les poissons provenant des restaurants et des exploitations agricoles contenant une proportion variable de résidus d'antimicrobiens non classés (tableau 1). L'analyse HPLC a indiqué que 62 échantillons de poissons (39,4 %) contenaient de l'oxytétracycline détectable. Les concentrations d'oxytétracycline dans les échantillons de foie se situaient entre 234,3 et 987,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (moyenne = $875,32 \pm 45\text{SD } \mu\text{g kg}^{-1}$), tandis que la concentration dans les filets se situait entre 22,5 et 553,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (moyenne = $257,2 \pm 133 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Olufemi et Basiru, 2013).

Quarante-trois (26,9 %) et 30 (18,8) échantillons de foie et de filets respectivement ont été détectés comme contenant des résidus d'oxytétracycline supérieurs à la limite maximale de résidus (LMR) du Codex de 600 et 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivement. Les distributions de la prévalence des résidus d'antimicrobiens et d'oxytétracycline dans les restaurants et les exploitations piscicoles étudiés sont présentées dans le tableau 1. La prévalence la plus élevée de résidus a été obtenue dans les restaurants. Il n'y avait pas de différence significative dans la prévalence des résidus d'antimicrobiens dans les différents endroits. Cependant, la concentration moyenne d'oxytétracycline dans le foie était significativement plus élevée ($p < 0,05$) que dans les filets (Olufemi et Basiru, 2013).

Tableau 05 : valeurs moyennes de récupération à différents niveaux d'oxytétracycline (Olufemi et Basiru, 2013).

Pointe ($\mu\text{g/ kg}$)	Taux de récupération moyen (%)	ETR %	Coefficients de variation (CV)
0.5	85.5	2.38	2.4
1.0	86.0	2.12	2.1
2.5	87.8	1.43	2.2
10	88.5	2.14	1.2

Tableau 06 : Résidus d'antimicrobiens et d'oxytétracycline dans les restaurants et les fermes aquacoles à Ibadan (Olufemi et Basiru, 2013).

Exemple de localisation des poissons	Échantillons positifs (test de dépistage Premi®)		Échantillons avec otc détectable par HPLC		Echantillon avec otc>LMR	
	Foie n=40	Muscle n=40	Foie n=40	Muscle n=40	Foie n=40	Muscle n=40
Restaurant Samonda	26 (65.0)	20 (50.0)	14 (35.0)	15 (37.5)	10 (25.0)	10 (25.0)
Restaurant Adamasingba	19 (47.5)	16 (40.0)	11 (27.5)	8 (20.0)	8 (20.0)	6 (15.0)
Restaurant Iwo Road	23 (57.5)	23 (57.5)	15 (37.5)	10 (25.0)	8 (20.0)	4 (10.0)
Ferme AquaLink	16 (40.0)	13 (32.5)	12 (30.0)	9 (22.5)	9 (22.5)	6 (15.0)
Ferme piscicole d'Oredegbe	14 (35.0)	12 (30.0)	11 (27.5)	6 (15.0)	8 (20.0)	4 (10.0)
Total	98 (61.3)	84 (52.5)	63 (39.4)	48 (30.0)	43 (26.9)	30 (18.8)

DISCUSSION

L'utilisation d'agents antimicrobiens chez les animaux producteurs d'aliments est devenue une grande préoccupation de santé publique, en particulier dans les pays en développement où ils sont administrés sans discernement (Jafari *et al.*, 2007). La plupart des médicaments utilisés par les aquaculteurs interrogés n'étaient pas spécifiquement indiqués pour les poissons, l'utilisation d'antibiotiques supplémentaires, principalement pour la volaille et les humains, a été observée comme étant une pratique courante. Cette pratique, associée au nombre insuffisant de vétérinaires formés à la médecine des poissons et au manque de connaissances des personnes interrogées en matière de sécurité alimentaire (délais d'attente et résidus dans les poissons), présente un risque pour la santé publique. L'inefficacité des réglementations relatives à la manipulation et à l'utilisation des médicaments vétérinaires au Nigeria pourrait également expliquer ces pratiques. Certains pays ou régions, tels que les pays européens, le Canada et la Norvège, approuvent un nombre limité d'antibiotiques

spécifiquement destinés à l'aquaculture. Au Canada, les antibiotiques approuvés pour l'aquaculture sont : l'oxytétracycline, la sulfadiazine (triméthoprime), la sulfadiméthoxine (ormétoprime) et le florfenicol. Aux États-Unis, les sulfonamides et les tétracyclines sont deux classes d'antibiotiques largement utilisées en aquaculture pour traiter les infections chez les poissons (Romero *et al.*, 2007).

La croissance accélérée de l'aquaculture dans le pays, comme on l'a vu à Ibadan, pourrait entraîner une pollution du milieu aquatique par de grandes quantités d'antibiotiques et la présence d'antibiotiques résiduels dans les tissus et les produits de la pêche. Cela a été confirmé par la forte prévalence des résidus obtenus par le criblage, dont moins d'échantillons contenaient de l'oxytétracycline. La plupart des échantillons positifs au Premi [®]Test contiennent plus d'un antibiotique, car le test est sensible à plusieurs groupes d'agents antimicrobiens. Il existe également une possibilité de résultats faussement positifs en raison de l'interférence des matrices tissulaires avec l'inhibition. Toutefois, une prévalence appréciable (39,4 % à 30,0 % du foie et des filets respectivement) de résidus d'oxytétracycline dans l'échantillon a confirmé que le médicament était l'un des antibiotiques fréquemment utilisés chez le poisson-chat. L'oxytétracycline étant un antibiotique à large spectre et bon marché, largement utilisé par les éleveurs, ce qui a été confirmé par les réponses à un questionnaire, ce qui en fait l'antibiotique le plus utilisé à mauvais escient en aquaculture. Ainsi, la présence de résidus d'oxytétracycline détectables dans 39,4 % des échantillons a confirmé le niveau de mauvaise utilisation ou d'abus des antibiotiques par les producteurs. Ces résultats concordent avec ceux d'autres études réalisées au Nigeria sur des produits alimentaires d'origine animale (Dipeolu et Alonge, 2002 ; Kabir *et al.*, 2004 ; Fagbamila *et al.*, 2010 ; Olatoye et Saraye, 2012).

Toutefois, il n'y a eu que peu ou pas d'enquêtes et d'analyses quantitatives sur les antibiotiques présents dans le poisson consommé à Ibadan. La prévalence plus élevée de la présence d'antimicrobiens et de résidus d'antibiotiques dans les restaurants pourrait être due à l'utilisation d'aliments locaux enrichis en antibiotiques juste avant la récolte du poisson, afin de stimuler la croissance, de prévenir ou de traiter les maladies et de protéger le poisson contre le stress lié au transport. Ainsi, la proportion plus élevée d'échantillons (26,9 % de foie et 18,8 filets) contenant de l'oxytétracycline au-dessus de la LMR du codex indique que le délai d'attente et les risques pour l'homme associés aux résidus d'antibiotiques dans les poissons ne sont pas préoccupants pour les éleveurs. Cháfer – Pericás (Cháfer – Pericás *et al.*,

2010) a montré que le délai d'attente nécessaire pour réduire la concentration d'oxytétracycline autour de la LMR avant la commercialisation des poissons de Méditerranée était d'environ 37 jours (Olufemi et Basiru, 2013).

L'élevage du poisson-chat est une activité en pleine expansion au Nigeria, notamment à Ibadan, qui attire l'attention d'un grand nombre de personnes ayant des niveaux d'éducation différents. Cette étude a révélé que la plupart des éleveurs d'Ibadan ont un faible niveau d'éducation et ont un accès illimité aux antibiotiques (en vente libre), s'adonnant ainsi à l'automédication de leurs stocks comme pratique courante sans diagnostic approprié et sans observer la période de retrait. Une forte proportion (75 %) des personnes interrogées dans le cadre de cette étude ne connaissaient pas les dépôts de résidus dans la chair de poisson et leurs conséquences sur la santé publique. Cela pourrait expliquer le non-respect des délais d'attente par la plupart de ces éleveurs, ainsi que la forte prévalence des résidus d'antimicrobiens dans la présente étude. Les pratiques peu hygiéniques qui caractérisent les exploitations étudiées avec étang de terre pourraient être un facteur prédisposant à l'apparition de maladies et à l'utilisation fréquente d'antimicrobiens prophylactiques et thérapeutiques, selon les résultats des questionnaires administrés. Ces pratiques peuvent avoir une incidence sur la présence de résidus d'antimicrobiens dans les poissons et sur les conséquences de la résistance des bactéries (Olufemi et Basiru, 2013).

IV.2. Article 02

RESULTATS

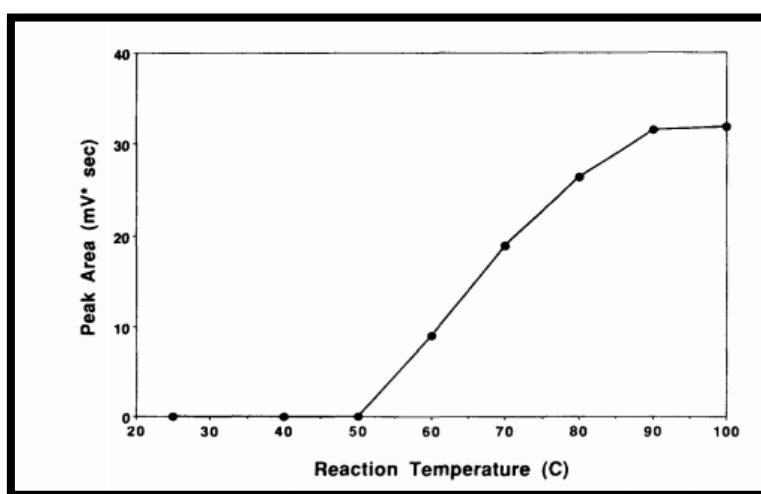


Figure 15 : Effet de la température de réaction sur la formation du produit fluorescent à partir de 50 ng/ml d'amoxicilline en 30 min (Ang *et al.*, 1996).

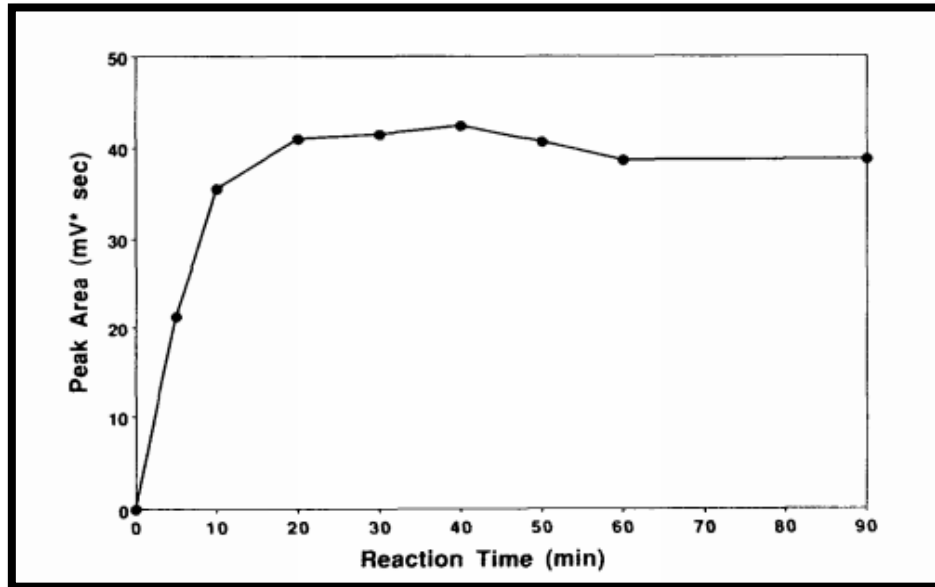


Figure 16 : Effet du temps de réaction sur la formation de produit fluorescent à partir de 50ng/ml d'amoxicilline à 100°C (Ang *et al.*, 1996).

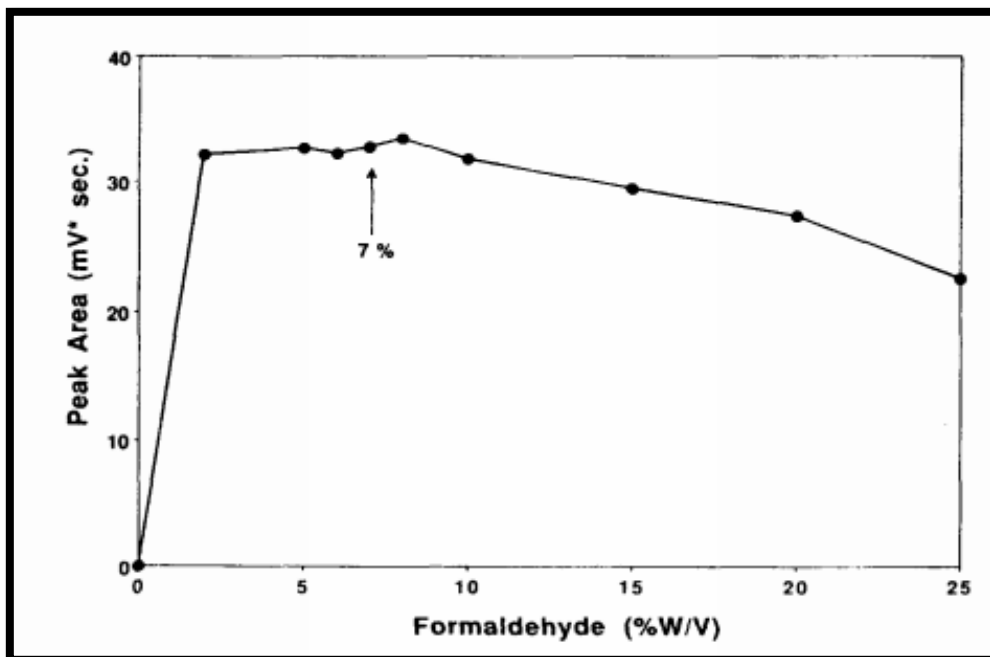


Figure 17 : Effet de la concentration de formaldéhyde dans une solution tampon d'acide citrique sur la formation d'un produit fluorescent à partir de 50 ng/ml d'amoxicilline (réaction à 100°C pendant 30 min) (Ang *et al.*, 1996).

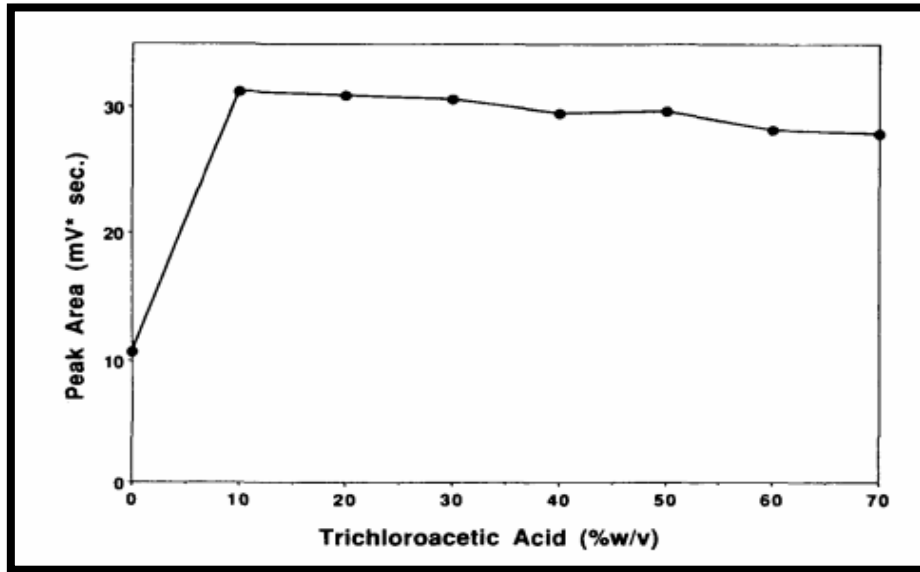


Figure 18 : Effet de la concentration d'acide trichloroacétique sur la formation d'un produit fluorescent à partir de 50 ng/ml d'amoxicilline (réaction à 100°C pendant 30 min) (Ang *et al.*, 1996).

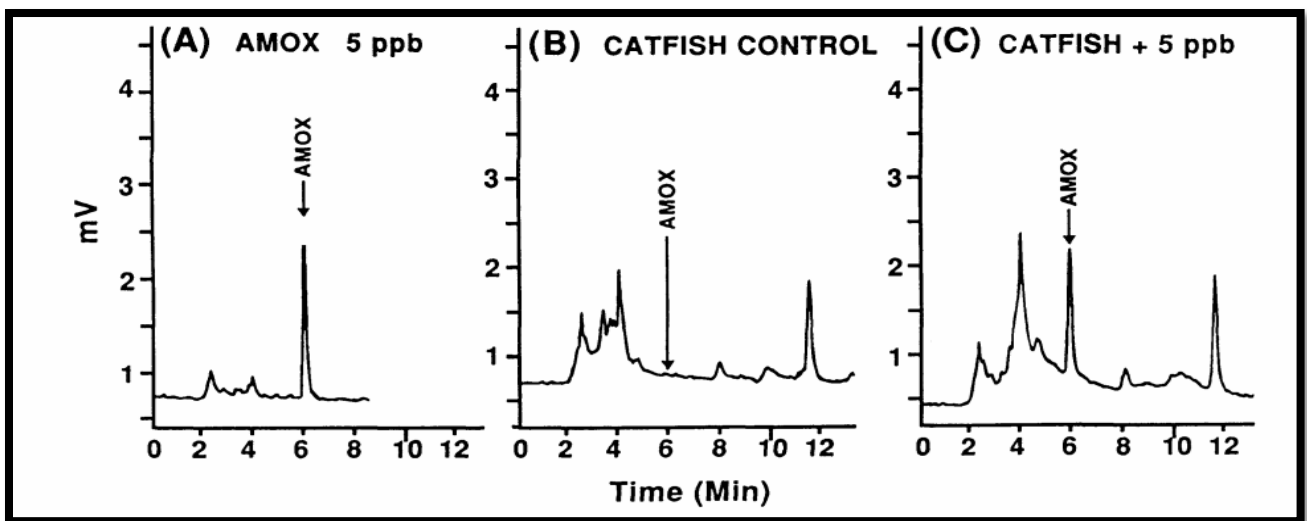


Figure 19 : Chromatogrammes de (A) solution standard d'amoxicilline, 2,5ng/injection, (B) contrôle du tissu musculaire du poisson-chat, et (C) tissu musculaire du poisson-chat dopé à l'amoxicilline à 5 ng/g (Ang *et al.*, 1996).

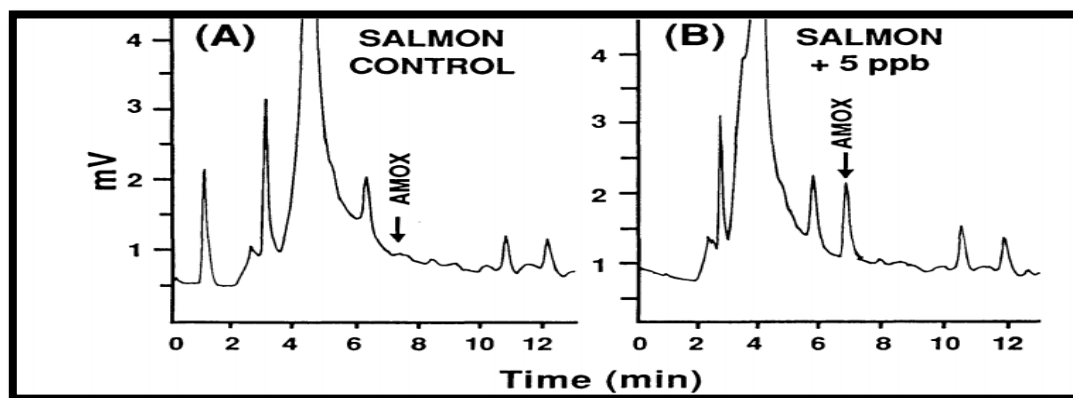


Figure 20 : Chromatogrammes de (A) tissu musculaire de contrôle de saumon et (B) tissu musculaire de saumon dopé à l'amoxicilline à 5 ng/g (Ang *et al.*, 1996).

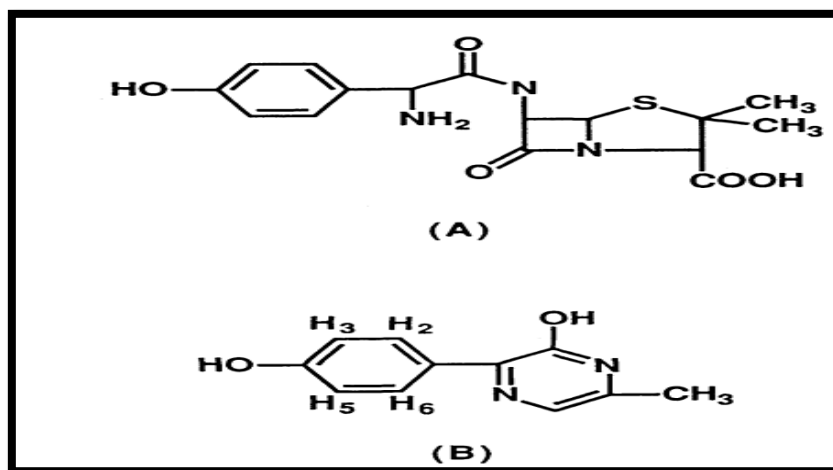


Figure 21 : Structures de (A) l'amoxicilline et (B) son principal dérivé, la 2-hydroxy-3-phénol-6-méthylpyrazine (Ang *et al.*, 1996).

Tableau 07 : Récupération d'amoxicilline dans les échantillons de tissu musculaire de poisson-chat dopé (Ang *et al.*, 1996).

Quantité dopée ng/g (ppb)	Récupération dans la journée %.			
	n	Moyenne		CV ^a
20	7	78.0	2.29	2.93
10	7	81.2	2.64	3.25
5.0	7	81.4	2.52	3.46
2.5	7	81.9	2.91	3.55
Contrôle	7	ND ^b	-	-

Moyenne		80.2	2.48	3.24
Quantité dopée ng/g (ppb)	Recouvrement au quotidien %			
	n	Moyenne	SD	CV ^a
20	7	82.0	2.91	3.55
10	7	81.4	2.80	3.43
5.0	7	80.6	3.04	3.77
Contrôle	7	ND ^b	-	-
Moyenne		81.4	2.92	3.58

a CV = (SD/moyenne) x100%. b Aucun détecté (<0,5 ppb).

Tableau 08 : Récupération d'amoxicilline dans les échantillons de tissu musculaire de saumon dopé (Ang *et al.*, 1996).

Quantité dopée ng/g (ppb)	Récupération dans la journée %.			
	n	Moyenne	SD	CV ^a
20	7	76.2	3.21	4.21
10	7	79.5	2.40	3.02
5.0	7	77.7	2.79	3.59
2.5	5	67.0	3.65	5.45
Contrôle	7	ND ^b	-	-
Moyenne		75.1	3.01	4.07
Quantité dopée ng/g (ppb)	Recouvrement au quotidien %			
	n	Moyenne	SD	CV ^a
20	5	80.2	4.50	5.61
10	5	79.2	2.43	3.07
5.0	5	81.2	3.58	4.41
Contrôle	5	ND ^b	-	-
Moyenne		79.9	3.50	4.36

aCV = (SD/moyenne) x100%. b Aucun détecté (<0,8 ppb).

Tableau 09 : Données chromatographiques, spectrométriques de masse et spectroscopiques 1 H-NMR du dérivé fluorescent de l'amoxicilline (2-hydroxy-3-phénol-6-méthylpyrazine) (Ang *et al.*, 1996).

Temps de rétention de CL ^a	Maxima UV ^b	El masse de spectre ^c	Décalages chimiques du spectre ^{d,e}			
			RMN 1H, ppm			
6.9 min	250,357	51(11), 54(10), 55(6), 65(6), 77(8), 101 (7), 105(8), 119(8), 120(10), 133(16), 146(5), 173(38), 174(28), 202(100), 203(10)	CH ₃	H _{3,5}	H ₁₁	H _{2,6}
			2.28	6.84	7.21	8.37
a : Temps de rétention de la CL en utilisant le système de CL analytique décrit dans la section Expérimental.						
b : Maxima d'absorption (nm) obtenu avec un détecteur de CL à réseau de photodiodes. Les spectres ont été obtenus entre 220 et 400 nm.						
c : Données spectrales de masse de l'ionisation des électrons (EI). Seuls les fragments d'ions ayant une intensité relative d'au moins 5% sont répertoriés. Le nombre entre parenthèses est l'intensité relative (%) observée.						
d : Les spectres de résonance magnétique nucléaire des protons ont été enregistrés à 500 MHz dans l'acétone-d ₆ , et les décalages chimiques (ppm) ont été déterminés après avoir attribué le plus grand pic de solvant résiduel à 2,04 ppm.						
e : Les constantes de couplage sont J ₂₃ = 8,8 Hz ; JCH ₃ t ₁₁ = 0,9 Hz.						

DISCUSSION

IV.2.1. Extraction et déprotéinisation

Lors d'expériences préliminaires, plusieurs systèmes de solvants ont été testés pour l'extraction et la déprotéinisation. Le méthanol a été testé comme solvant d'extraction, mais il a coextrait des quantités considérables de lipides. (USDA-FSIS, 1987) utilisant l'eau comme solvant d'extraction a également été testée. Cependant, une certaine masse gélatineuse s'est formée après que le tissu musculaire du poisson-chat ait été homogénéisé avec de l'eau. Le

liquide n'a pas pu être séparé du gel, surtout lorsque des échantillons de filets de poisson-chat très frais ont été utilisés. Des solutions tampons de différentes valeurs de pH (2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 et 7.5) ont également été évaluées (Ang *et al.*, 1996).

Les mélanges homogénéisés avec des tampons de pH 2,5, 6,5 et 7,5 étaient difficiles à séparer complètement par centrifugation, et les récupérations d'amoxicilline dopée étaient faibles. Les solutions tampons de pH 3,5, 4,5 et 5,5 ont donné des récupérations plus élevées que les tampons d'autres pH. Le tampon de pH 4,5 a été le plus efficace pour faciliter la séparation entre les phases liquide et solide après la centrifugation, probablement parce que le pH 4,5 est proche des points isoélectriques des protéines de poisson. Le tampon de pH 4,5 a donc été sélectionné pour des expériences ultérieures. Les échantillons ont été extraits deux fois pour une meilleure récupération. La solution de TCA à 75% utilisée dans la déprotéinisation a facilité l'utilisation d'une cartouche C18 pour l'extraction en phase solide. Le résidu d'amoxicilline dans l'extrait était adsorbé sur la cartouche jusqu'à ce qu'il soit élué par l'acétonitrile. Des traces de lipides, d'autres substances interférentes non polaires et d'acétonitrile dans l'éluat ont été éliminées par l'éther (Ang *et al.*, 1996).

IV.2.2. Formation d'un dérivé fluorescent

Des dérivés fluorescents se forment lorsque l'ampicilline est chauffée avec du formaldéhyde dans une solution acide (Jusko, 1971; Ono *et al.*, 1981). Récemment, Lai (Lai *et al.*, 1994) ont mis au point une méthode de CL avec détection de fluorescence pour la détermination de l'ampicilline dans le sérum à l'état de traces, en utilisant la dérivatisation du formaldéhyde en précolonne. Une technique similaire pour l'analyse de l'amoxicilline a été signalée par le FSIS (US-CFR, 1984). Cependant, les détails concernant l'optimisation des conditions de dérivatisation n'ont pas été communiqués. Par exemple, la méthode de Lai (Lai *et al.*, 1994) nécessite un chauffage à 90 °C pendant 2 h, alors que la méthode FSIS (US-CFR, 1984) nécessite un chauffage à 95 °C pendant 2 h et 20 min. Comme aucune information n'était disponible concernant les exigences en matière de temps de réaction, de température et d'autres conditions, une enquête systématique a été menée dans le cadre de la présente étude. Des aliquotes en double d'une solution standard de travail contenant 50 ng/ml d'amoxicilline ont été réalisées tout au long de cette phase de l'expérience. La réponse fluorescente a été analysée par CL comme indiqué précédemment. Les températures de réaction ont été testées de la température ambiante (environ 25 °C) à 100 °C pendant 30 minutes. La réponse de

fluorescence maximale a été obtenue pour les réactions à 90° à 100°C (fig 15) (Ang *et al.*, 1996).

Pour les expériences ultérieures, la température de 100°C a été choisie parce qu'un bain d'eau bouillante est généralement peu coûteux et facilement disponible en laboratoires. Le temps de réaction à 100°C a été testé de 0 à 95 min. La surface du pic a augmenté avec le temps et a atteint un plateau entre 20 et 50 min (fig16) (Ang *et al.*, 1996).

Une légère diminution s'est produite après 60 min. Un temps de réaction de 30 min a été choisi pour les expériences ultérieures, ce qui a permis de gagner au moins 90 min de temps d'analyse, par rapport aux méthodes de Lai (Lai *et al.*, 1994) et FSIS (US-CFR, 1984).

Les concentrations optimales de formaldéhyde dans les solutions tampon d'acide citrique et de TCA ont été testées pour la formation de produit fluorescent. La réponse fluorescente maximale s'est produite avec une solution de formaldéhyde de 2,5 à 10 % (fig17) (Catharina *et al.*, 1996). Et avec une solution de TCA de 10 à 30 % (fig18) (Ang *et al.*, 1996).

Comme pour les méthodes précédentes (Lai *et al.*, 1994; US-CFR, 1984), des solutions de formaldéhyde à 7 % et de TCA à 20 % ont été sélectionnées pour des travaux ultérieurs. Comme ces conditions se situaient dans la région du plateau de réponse maximale, toute légère variation de ces conditions n'affecterait pas les résultats d'analyse. Les expériences préliminaires ont également montré que l'activité fluorescente était stable sous réfrigération pendant au moins une semaine. En opération de routine, 4 échantillons peuvent être analysés en une journée. Si plus de 4 échantillons doivent être analysés en un seul passage, les tubes de réaction après dérivatisation et refroidissement peuvent être conservés dans un réfrigérateur pendant la nuit et l'analyse peut être terminée le lendemain (Ang *et al.*, 1996).

IV.2.3. Séparation et détection de CL

Diverses proportions de solution tampon d'acétonitrile et de phosphate dans la phase mobile ont été testées, ainsi que divers pH de solution tampon. Un mélange de 20 parties d'acétonitrile et de 80 parties de tampon de phosphate à un pH de 5,6 a donné les meilleurs résultats pour les échantillons de poissons. Le débit a été modifié de 1 ml/min à 2 ml/min après 10 minutes pour faciliter l'élution des composés à élution tardive avant l'injection suivante. Un temps de fonctionnement total de 20 min était suffisant pour chaque injection

d'échantillon. Aucun pic parasite de l'extrait de poisson témoin n'a été observé au même temps de rétention que le dérivé d'amoxicilline. Diverses colonnes CL ont également été testées (Supelcosil LC-ABZ, Synchronapak SCD-100 et MetaChem C4/E) (Ang *et al.*, 1996).

Le Spherisorb S5 ODS2 a donné les meilleures résolutions dans les conditions expérimentales actuelles. Des exemples de chromatogrammes de l'étalon, du poisson-chat de contrôle et du poisson-chat dopé à l'amoxicilline à 5 ppb sont présentés à la figure 19 (Ang *et al.*, 1996).

Chromatogrammes de tissu musculaire de saumon témoin et de saumon dopé sont présentés à la figure 20 (Ang *et al.*, 1996).

La courbe d'étalonnage standard de la surface du pic en fonction de la concentration était linéaire ($r = 0.99998$) pour la plage comprise entre 0 et 500 ng/ml, et l'interception était négligeable ($Y = 18.73X - 0.52$, où Y est la réponse fluorescente [mVs] et X est l'amoxicilline [ng/ml]). La limite de détection de l'instrument pour le dérivé de l'amoxicilline à un rapport signal/bruit de 3:1 était de 100 pg par injection (50 μ L d'injection de 2 ng/ml d'amoxicilline). La variation de l'analyse au jour le jour a été déterminé en comparant la réponse fluorescente de la solution standard de travail quotidien. Sur une période de 10 jours, la surface du pic (moyenne \pm écart-type [SD]) de la solution étalon de 50 ng/ml était de $37\,390 \pm 1657$ fV-sec avec un coefficient de variation (CV) de 4,43 %. Afin de minimiser les variations des calibrages des instruments causées par les réactifs ou la phase mobile, il est recommandé d'utiliser une solution étalon de travail en double pour l'analyse quotidienne. Selon la directive de la FDA pour l'approbation des méthodes d'analyse des résidus (US-FDA, 1986), les méthodes doivent pouvoir déterminer les résidus au niveau concerné ou au niveau de tolérance ainsi qu'à la moitié et au double du niveau de tolérance. Pour les niveaux de résidus inférieurs à 0,1 ppm, la variation intra-laboratoire (CV) ne doit pas dépasser 20 % et la récupération moyenne doit être comprise entre 60 et 110 % dans les cas > 5). Des échantillons dopés à 5, 10 et 20 ppb ont été analysés, car le niveau préoccupant pour l'amoxicilline dans les tissus des poissons est de 10 ppb. Le niveau de dopage à 2,5 ppb a également été testé parce que le signal de fond du chromatogramme du témoin était faible. Les taux de récupération des échantillons de poissons-chats dopés sont indiqués dans le tableau 07 (Ang *et al.*, 1996).

La moyenne des récupérations était supérieure à 80 %, tant pour les variations intra-journalières que pour les variations journalières. Les CV étaient inférieurs à 4 %, ce qui montre la grande précision de la méthode. Les récupérations et les CV se situaient dans la fourchette acceptable établie par la FDA (US-FDA, 1986). La méthode est appliquée pour déterminer l'amoxicilline à des niveaux aussi bas que 5 ppb dans le tissu musculaire du poisson-chat. Sur la base des directives de l'American Chemical Society (American Chemical Society, 1980), la limite de détection (LOD) a été estimée à 3 fois l'écart-type du blanc plus la réponse moyenne du blanc (MBR), tandis que la limite de quantification (LOQ) a été calculée comme 10 écart-type à partir du MBR. La LOD et la LOQ de l'amoxicilline dans les tissus musculaires du poisson-chat étaient respectivement de 0,5 et 1,2 ppb. Les données de récupération des tissus musculaires de saumon dopé sont présentées dans le tableau 08 (Ang *et al.*, 1996).

En raison de l'interférence des composés, les taux de récupération de l'amoxicilline dopée dans les tissus musculaires de saumon étaient généralement inférieurs à celles des tissus de poisson-chat. Néanmoins, les récupérations en un jour étaient encore supérieures à 76 % pour les échantillons dopés à 5, 10 et 20 ppb. Les CV (%) étaient satisfaisants selon les critères de la FDA (US-FDA, 1986). À un niveau de pic de 2,5 ppb, environ 67 % de l'amoxicilline dopée a été récupérée et le CV (5,45 %) était acceptable. Les taux de récupération et les CV des expériences de variation quotidienne étaient légèrement meilleurs que ceux des expériences en cours de journée. La méthode est applicable pour déterminer les résidus d'amoxicilline à 5 ppb dans le tissu musculaire du saumon. La LOD et la LOQ pour l'amoxicilline dans les échantillons de saumon étaient de 0,8 et 2,0 ppb, respectivement. La méthode est applicable à l'analyse de traces d'amoxicilline dans les tissus musculaires de poisson-chat et de saumon (Ang *et al.*, 1996).

IV.2.4. Identification du dérivé de l'amoxicilline

L'échantillon a produit un ion moléculaire apparent à m/z 202, qui était le pic de base du spectre. Les fragments d'ions observés sont indiqués dans le tableau 3. L'ion moléculaire apparent et les ions fragments observés sont conformes à la structure chimique proposée de la 2-hydroxy-3-phénol-6-méthylpyrazine (fig 21) (Ang *et al.*, 1996).

Mais n'excluent pas d'autres structures. Le spectre de masse a été comparé aux spectres de la bibliothèque Finnigan MAT INCOS et de la bibliothèque de spectres de masse

du National Institute for Standards and Technology. Aucune correspondance acceptable n'a été trouvée, car aucune des deux bibliothèques ne contenait le spectre de la structure proposée. Un résumé des données des identifications instrumentales est présenté dans le tableau 09 (Ang *et al.*, 1996).

Les spectres RMN obtenus étaient conformes à la structure proposée. Les assignations de résonance protonique ont été faites sur la base des décalages chimiques et des constantes de couplage. Un produit fluorescent similaire, la 2-hydroxy-3-phényl-6-méthylpyrazine, provenant de la réaction de l'ampicilline avec le formaldéhyde et les solutions de TCA (Ono *et al.*, 1981).

IV.3. Article 03

RESULTATS

Tableau 10 : Comptages à blanc par minute pour les différentes espèces de poissons obtenus par la technique Charm II (Mukota *et al.*, 2020).

Résultats du compteur à scintillation (cpm)										
Test du charme II	β-lactams kit		Sulfonamides kit		Tetracyclines kit		Macrolides kit		Streptomycins kit	
	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD
Tilapia	2704	0.9	2596	736	3027	0.7	2448	191.1	5103	346
Truite	2506	192.0	2332	1184	2830	260	2799	87.1	4799	259.9
Saumon	2571	207.4	2472	541.2	2939	165.0	2110	117.2	3085	133.4
Pangasius	2469	195.7	5625	1254	2931	221.4	2893	110	4796	437.7
Bar	2432	232.1	2144	672.1	2971	252.2	2700	153.6	4805	594.7
Dorade	2512	171.1	1977	621.4	2864	93.4	2803	167.3	4967	485.8
Poisson-chat	2493	312.7	5872	774.3						
Lingue			4454	650.1						
Cpm : compte par minute.										
SD : écart type										

Tableau 11 : Points de contrôle pour les différents antimicrobiens dans les échantillons de poissons blancs (Mukota *et al.*, 2020).

Antimicrobiens	Échantillons dopés				Échantillons vierges			
	Niveau de dopage de l'analyte ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cpm moy des échantillons dopés	Prise en compte de l'effet de matrice	cpm	Moy des cpm vides	Gamme des lectures de cpm vierges	N° de faux positifs/N° d'échantillons	Taux de faux positifs (%)
β-lactams	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ penicillin G	1275	Cpm+20 % en pointe	1530	2502	2160–2907	0/30	0
Sulfonamides	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sulfamethazine	1096	Cpm+30 % en pointe	1424	3162	1431–6995	0/30	0
Tétracyclines	0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tétracycline	2524	Cpm vierge - 40%	1514	2524	2451–3269	0/30	0
Macrolides	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erythromycin A	1765	Cpm+20 % en pointe	2118	2587	1906–2952	1/28	3.6
Streptomycine	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ streptomycine	2574	Cpm+30 % peak	3346	4605	2942–5488	1/20	5.0
Nombre d'échantillons utilisés par paramètre $N_s \geq 20$								

DISCUSSION

IV.3.1. Comptage par minute pour les échantillons blancs

Les échantillons blancs utilisés dans l'étude étaient les matrices de tissus de poissons qui ont été soumises à la procédure d'analyse complète, et aucun résidu antimicrobien n'a été détecté dans ces matrices à l'aide des kits de test Charm II respectifs (Charm Sciences, 2014).

Les échantillons de poissons vierges auxquels le liant et le traceur avaient été ajoutés, mais sans ajout d'agent antimicrobien, ont été extraits avec les différents kits et lus sur les canaux respectifs. Les résultats de CPM pour les échantillons de poissons blancs sont résumés dans le tableau 1 (Mukota *et al.*, 2020).

D'après le tableau 10, les cpm des espèces de tilapia, truite, saumon, pangasius, bar, dorade, poisson-chat et poisson-lingue ont été évaluées statistiquement à l'aide de l'ANOVA et il a été constaté que le F global calculé (0,22) était inférieur au F critique (2.5), ce qui implique qu'il n'y avait pas de différence significative entre les résultats des échantillons de poissons blancs des espèces susmentionnées lors de l'utilisation de kits de tests antimicrobiens pour les β -lactames, tétracyclines, macrolides et streptomycines. Toutefois, des différences significatives dans les valeurs de la ppm ont été observées avec le kit d'extraction des sulfamides lors de tests sur le poisson-chat, la lingue et le pangasius. Les cpm de ces espèces étaient presque le double de celles des autres types de poissons et leur F-calculé (15,1) était supérieur au F-critique (2,4). La grande variation des cpm pour les espèces de poissons-chats, de lingue et de pangasius par rapport aux autres espèces peut être attribuée à la forte teneur en graisse des poissons de la mer Baltique extraite par le protocole du kit sulfamide. À cet égard, les trois espèces de poissons (poisson-chat, lingue et pangasius) doivent être traitées séparément lors du calcul des points de contrôle afin de minimiser les risques d'obtenir des résultats faux négatifs ou faux positifs. Pour les autres espèces de poissons, les résultats de la CPM à blanc ont été utilisés pour calculer les points de contrôle respectifs pour les différents résidus (Mukota *et al.*, 2020).

IV.3.2. Évaluation des points de contrôle pour les différents médicaments résidus

Le point de contrôle (CP) d'un échantillon est le point de coupure entre un résultat négatif ou positif. Tout agent antimicrobien présent dans l'extrait d'échantillon est en concurrence en liant les sites avec le traceur, donc, plus le cpm mesuré est important, plus la concentration de médicaments antimicrobiens dans l'échantillon est faible et vice versa. Les échantillons à forte concentration sont considérés comme négatifs (les antimicrobiens traceurs sont largement liés au liant) tandis que ceux à faible concentration sont considérés comme positifs (les antimicrobiens traceurs sont largement libres en solution). Le PC des différents antimicrobiens a été déterminé indépendamment et, à l'exception des tétracyclines, la valeur de la LMR de chaque médicament a été ajoutée à l'échantillon de poisson blanc correspondant. Afin de tenir compte des écarts entre les différentes matrices de poissons, un

pourcentage de tolérance a été ajouté ou soustrait de la valeur moyenne du PC obtenu pour l'échantillon de poisson blanc dopé (Mukota *et al.*, 2020).

L'évaluation du PC a été effectuée conformément au protocole du Charme II, et les pourcentages ajoutés à la valeur moyenne des échantillons dopés à la capacité de détection ou soustraits de la valeur moyenne des blancs servent à minimiser l'occurrence de lectures faussement positives ou négatives (Charm Sciences, 2014 ; Charm et Chi, 1988 ; Korsrud *et al.*, 1995).

À cet égard, le PC pour les β -lactames a été évalué en calculant la moyenne des résultats de 6 échantillons négatifs dopés à la pénicilline G à 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,5 LMR) et en ajoutant 20 % de la valeur moyenne du PC obtenu. En ce qui concerne les sulfamides, le PC a été évalué en calculant la moyenne des résultats des échantillons négatifs dopés à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec de la sulfaméthazine et en ajoutant 30 % de la valeur moyenne de la ppm obtenue (Mukota *et al.*, 2020).

Un point de contrôle de 1530 a été calculé pour les β -lactams. D'autre part, le PC pour les tétracyclines a été calculée en faisant la moyenne des résultats de la cpm des étalons de contrôle négatifs fournis dans le kit de test des tétracyclines et en soustrayant 40 % de la valeur moyenne de la cpm obtenue (tableau 11) (Mukota *et al.*, 2020).

Pour les macrolides, la PC a été obtenue en calculant la moyenne des résultats de 6 échantillons négatifs dopés à l'érythromycine A à 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,5 LMR) et en ajoutant 20 % de la valeur moyenne de la PC obtenue. En utilisant une approche similaire, le PC pour la streptomycine a été dérivée en calculant la moyenne des résultats des échantillons négatifs dopés à 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec de la streptomycine et en ajoutant 30 % de la valeur moyenne du cpm obtenu. Lors de l'analyse des résidus d'antimicrobiens dans les échantillons de poisson, les résultats inférieurs ou égaux à chaque CP ont été interprétés comme positifs, tandis que ceux qui sont supérieurs au CP, comme négatifs. Les lectures d'échantillons blancs inférieures à la PC fixée ont été considérées comme faussement positives. Les résultats du tableau 11, montrent que le taux de faux positifs était de 0% pour les tétracyclines, β -lactames et sulfamides ; 3,6% pour les macrolides, et 5% pour la streptomycine ; ceci a prouvé la validité des puisqu'il a satisfait aux critères d'acceptation d'être à moins de 5% (Mukota *et al.*, 2020).

Conclusion

En matière d'élevage, les animaux terrestres ne sont pas les seules sources d'antibiorésistance: l'aquaculture recourt aussi largement aux antibiotiques. Et ce aussi bien dans les pays asiatiques, où le sujet est peu régulé, que dans les pays du Nord, révèle une étude publiée dans le Journal of Hazardous Materials.

Estimée à 83 millions de tonnes par an, l'aquaculture mondiale constitue désormais 40% de notre alimentation en produits de la mer, contre seulement 4% en 1970. Une solution à la surpêche, certes, mais aussi une pollution additionnelle pour la mer, notamment en termes de déchets.

En surdensité, les poissons sont plus à risque de maladies, ce qui pousse les producteurs à avoir la main lourde sur les antibiotiques. Le problème est d'autant plus important que les grands pays producteurs, ceux d'Asie du Sud-est, disposent d'une faible réglementation quant à l'usage des antibiotiques.

Mais les producteurs du Nord ne sont pas hors de tout reproche, révèlent les travaux publiés par deux chercheurs de l'université d'Etat de l'Arizona. Cette étude, la plus large à ce jour à avoir évalué la présence d'antibiotiques dans des produits d'aquaculture, a porté sur 27 échantillons issus de 11 pays, représentant 6 espèces: crevette, saumon, poisson-chat, truite, tilapia et panga. 47 antibiotiques étaient analysés et 5 souvent retrouvés, dont l'oxytétracycline, médicament le plus fréquent en aquaculture, notamment dans les pays du Nord. Parmi les échantillons positifs, on retrouve du saumon canadien et chilien, du tilapia chinois et panaméen, ainsi que des truites US –espèce chez qui l'oxytétracycline entraîne des malformations.

Plus surprenant, cet antibiotique était même retrouvé en forte concentration chez des crevettes mexicaines pourtant d'origine sauvage. Ce que les chercheurs expliquent par un problème d'étiquetage, une forte pollution côtière par des résidus de médicaments, voire par une contamination croisée dans la chaîne de production. Certes, les concentrations mesurées, de l'ordre du nanogramme par gramme de produit, sont toutes en deçà des limites fixées par la Food and Drug Administration (FDA). Ces seuils réglementaires sont pourtant mis en cause par de nombreux experts, qui estiment que l'antibiorésistance se développe à des doses du même ordre de grandeur que celles observées dans l'étude.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

AFSSA. 2006. Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, Agence Française de sécurité sanitaire des aliments, page 46-49.

American Chemical Society Committee on Environmental Improvement .1980. Anal. Chem. 52, 2242-2249p.

Ang Catharina YW, Luo Wenhong, Hansen Eugene B, freeman James P, Thompson Harold C. 1996. Determination of Amoxicillin in Catfish and Salmon Tissues by Liquid Chromatography with Precolumn Formaldehyde Derivatization. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. 2(79). 389p

Baquero F, Martinez JL, Canton R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, page 45.

Barnabe G. 1989. L'aquaculture. Volume1, 2^{ème} édition (Tech et Doc. Laveisres 1989). 564p.

Barnabe G. 1991. Base biologique et écologique de l'aquaculture 1991.

Basurco B, Personal data. UICN. 2004. Mediterranean marine aquaculture and environment. Identification of issues.

Bendiksen EA, Jobling M. 2003. *Fish Physiol. Biochem.* 29: 133-140.

Benidiri R. 2017. Création d'un projet piscicole. Mémoire de master. Université Abou Baker Blelkaid. Tlemcen, 92p.

Blanchard É. 1866. Poissons des eaux douces de la France. J.B.BALLI ÉRE ET FILS, Paris.656 p.

Bourin M, Lievre M, Allain H. 1993. Cours de pharmacologie,3^{ème} édition, chapitre médicaments anti-infectieux, page 291-307.

Braekkan OR. 1976. Den erneringssmesige betydning av fisk. *Fiskets Gang*, 35, 1976.

Bruyère F, Cariou G, Boiteux JP, Hoznek A, Mignard JP, Escarvage L, Bernard L, Sotto CJ. 2008. Pharmacologie des Antibiotiques, page2-60.

Cahu C, Zambonino IJ, Takeuchi T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227: 245-258.

Cars O, Diazhogberg L, Murray M, Nordlberg O, Sivaraman S, Tomoson G. 2008. Meeting in the challenge of antibiotic resistance. *Brit.Med*, J.337, page 726-728.

Chafer-Pericas C, Maquieira A, Puchades R. 2010. Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS-MS. *Aquacul. Res.*, 41: e217-e225.

Charm S, Chi R. 1988. Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. *J Assoc Of Anal Chem.* 71(2):304–316.

Charm Sciences. 2014. The Charm II radio receptor tests for detection of antimicrobials, Charm Sciences Inc, Lawrence, MA 01843-1032 USA.

Chataigner B, Stevens A. 2002. Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques commerciales à Dakar, page 4-15.

Châtaigner B, Stevens A. 2003. Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar (Institut Pasteur de Dakar), page 3–15, 51.

Chataigner B. 2004. Etude de la qualité sanitaire des viandes bovines et ovines à Dakar Sénégal. Contamination par des résidus d'antibiotiques. Thèse de doctorat vétérinaire Toulouse, page 103.

Chatellet MC. 2007. Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, page 9-90.

Chiheb M. 2006. Le développement de l'aquaculture en Algérie. *Journal de la filière aquacole en France ; Aquafilia N° :17.* Octobre/Novembre 2006. P 18-22.

CIHEAM- Options Méditerranéennes. 2008. « Situation actuelle de l'aquaculture méditerranéenne et nécessité d'une planification sectorielle vers un développement durable », Ph., FERLIN – INRA.

CODEX ALIMENTARIUS. 2005. Codex d'usage en matière d'hygiène pour les viandes FAO/OMS, page 55.

Corpet DE, Burgere HB. 1996. Résidus des antibiotiques dans les aliments d'origine animale conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effets chez l'homme. *Rev. Méd. Vét*, page 72-82.

Corpet DE, Brugere HB. 1995. Résidus antibiotiques dans les aliments d'origine animale : conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effet chez l'homme, page 73-82.

Dipeolu MA, Alonge DO. 2002. Residue of Streptomycin antibiotics in meat sold for human consumption in some states of SW Nigeria. *Archios de Zootechnia*, 51: 447 – 480.

Duval J, Soussy CJ. 1990. Antibiothérapie (4^{ème} édition), page 3-58.

EFSA. 2007. The community summary repon trends nd sources of zoonoses, zoonotic agents antimicrobial resistance and food borne out breaks in the European Union in 2005 Rapport may 2007 the EFSA Journal 94, 3-288.

Eloit M. 2004. Plan de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les viandes d'animaux de boucherie, de volailles, de gibiers ,de lapins et de poissons d'élevage, page 2.

Enriquez B. 2002. La pharmacovigilance vétérinaire : objectifs, mission, mise en œuvre et résultats, page 35-40.

European Commission Decision. 2002. Commission Decision 2002/657/EC Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm. Accessed 10 Sept 2019.

Fabre JM, Petit C, Bosquet G. 2006. Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, édition 2006, page 4.

Fagbamila I, J Kabir, P Abdu, G Omeiza, P Ankeli, S Ngulukun, M Muhammad, J Umoh. 2010. Antimicrobial Screening of Commercial Eggs and Determination of Tetracycline Residue Using Two Microbiological Methods. *International Journal of Poultry Science*, 9: 959-962.

FAO (Food Agriculture Organisation). 2018. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Atteindre les objectifs de développement durable. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Rome.

FAO. 2002. The state of insecurity in the world. Rome : FAO, 2002.

FAO. 2006. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture.

FAO. 2008. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2007, Rome.

FAO. 2009. Étude sur l'aquaculture en cage: la mer Méditerranée, Francesco Cardia Consultant en aquaculture, Via A Fabretti 8, 00161 Rome, Italie Alessandro Lovatelli Département des pêches et de l'aquaculture, FAO, 00153 Rome, Italie.

Ferlin Ph. 2008. État actuel de l'aquaculture en France. Communication CGAAER, Paris.

Fontaine M. 1992. Vade-mecum du vétérinaire, formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène, 15^{ème} édition, page 106-119.

Gaudin V, Maris P, Fuselier R, Ribouchon JL, Cadiaun, Rault A. 2004. Validation of a microbiological method the STAR protocol, a five plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. Food additives and contaminants, page 422-433

Gauthier E. 2006. Les antibiotiques : l'envers du miracle, page 1-3.

Gogny M, Puyt JD, Pellerin JL. 2001. Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, page 165-168.

Guillaume A, Desgrées du loù A, Koffi N, Zanou B. 1999. « Le recours a l'avortement : la situation en Cote d'ivoire ». Abidjan. ENSEA/IRD.50P

Hamdi MS, Sibachir MA. 2011. Contribution à l'élevage de la Daurade « Sparus aurata» en eau réchauffée : Cas de la ferme ONDPA Cap Djinet (wilaya de Boumerdes) Thèse d'ingénieur d'état en sciences de la mer , ISMAL (Alger) :1-9p.

Hirsh R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, page 109-118.

Huss HH. 1995. Qualité et son évolution dans le poisson frais. Document Technique sur les Pêches-348 FAO.L'Organisation des Nations Unies pour L'Alimentation et L'Agriculture, Rome. 206p.

IDEE. 2007. Rapport final, Développement de l'aquaculture à L'Ile Maurice étude du potentiel aquacole.

Jafari MT, Khayamian T, Shaer V, Zarei N. 2007. Determination of veterinary drugs residues in chicken meat using corona discharge ion mobility spectrometry. Anal. Chimica Acta. 581: 147-153.

Jean-Marie H. 2010. Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique ?, page 88.

Jusko WJ. 1971. /. Pharm. Sci. 5, 728-732.

Kabir J, VJ Umoh, E Audu-Okoh, JU Umoh, JKP Kwaga. 2004. Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residue in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna state, Nigeria. Food Contr., 15: 99-105.

Karali A et Echikh F. 2004. L'Aquaculture en Algérie, Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral : 4-5p.

Keith P, Persat H, Allardi J. 2011. Les poisons d'eau douce de France. Biotope-Mésumé national d'histoire naturelle, Paris.552p.

Klein G. 1999. Food as a potential vector for antibiotic résistances.1.Relevance of residues and selected food borne, Berliner and Michener Tierarztliche wochenschrif, page 365- 369.

Klotins K. 2006. Utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance : controverse et solutions.

Kolbener P. 2005. Résidus de médicaments vétérinaires, page1-2. Manuel suisse des denrées alimentaires. Chapitre 55.

Korsrud OG, Papich GM, Fesser CEA, Salibury DCC, Macneil DJ. 1995. Laboratory testing of the Charm II test receptor assays and the Charm Farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and Penicillin G. J Food Prot 59(2):161–166.

Kummerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment, page 75.

Lai J, Paliwal JK, Grover PK, Gupta RC. 1994. J. Chromatogr. B 655, 142-146.

Laurentie M, Sanders P. 2002. Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait, Bulletin des groupements techniques vétérinaires, page 197-201.

Leduc F. 2011. Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Thèse de Doctorat, Université Lille 1, 182p.

Leduc F. 2011. Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Thèse de Doctorat, Université Lille 1, 182p.

Lefèvre F, Cos I, Bugeon J. 2008. Déterminisme biologique de la qualité des poissons. Poster 12ème JSMTV.

Maage A, Julshamn K, Ulgenes Y. 1991. A comparison of tissue levels of four essential trace elements in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fiskeridir. Skr., Ser. Ernaering, IV*: 111-116.

Maatar A, Bouhaine Y. 2004. L'aquaculture en Algérie situation et perspectives, étude du lac EL MELLAH, Mémoire de docteur vétérinaire université Mentouri de Constantine. 140p.

Maillard R. 2002. Antibiothérapie respiratoire, la dépêche vétérinaire, page 15-17.

Medale F. 2004. Caractéristiques nutritionnelles des poissons et facteurs de variations. Sp. Issue 10èmes JSMTV, 87-93.

Medale F. 2004. Caractéristiques nutritionnelles des poissons et facteurs de variations. Sp. Issue 10èmes JSMTV, 87-93.

Medale F. 2005. Caractéristiques nutritionnelles des poissons et facteurs de variations. Equipe Nutrition et métabolisme en aquaculture, Station d'hydrobiologie INRA, France. 76p.

Medale F. 2008. Le poisson : quels enjeux pour sa consommation. La lettre scientifique de l'institut français pour la nutrition N° 130, p 20.

Medale F. 2009. Teneurs en lipides et composition en acides gras de la chair de poissons issues de la pêche et de l'élevage. Cahiers de nutrition et de diététique N°44, France. 173-181.

Mendel B, Kemp A, Myers DK. 1954. A colorimetric micro-method for the determination of glucose. *Biochemical Journal*, 56: 639 - 646.

Mevius DJ, Rutter JM, Hart CA, Imberechts H, Kempf G, Laffont JP, Luthman J, Moreno MA, Pantosti A, Pohl P, Wallasey CM. 1999. Antibiotic resistance in the European Union associated with the therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, page 1-57.

Milhaud G, Pinault L. 1999. Législation de la pharmacie vétérinaire. Editions le point vétérinaire. Chapitre III : évaluation des médicaments vétérinaires : Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), limites maximales de résidus (LMR), page 25-40.

Milhaud G. 1978. L'utilisation rationnelle des médicaments vétérinaires et le temps d'attente, page177-185.

Morin R, Uhland C, Lévesque G. 2005. L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec, page 6.

Moustgard J. 1957. Laerebog i husdyrenes Fysiologi og Ernaeringsfy'siologi. *A/S C.Fr. Mortensen*, Copenhagen.

Mukota Aziz Kimera, Gondam Melanie Flore Kamini, Tsafack Julie Judith Takadong, Sasanya James, Reybroeck Wim, Ntale Muhammad, Nyanzi Steven Allan, Tebandeke Emmanuel. 2020. Primary validation of Charm II tests for the detection of antimicrobial residues in a range of aquaculture fish. *BMC Chemistry* ; (2020) 14:32 P.

Muriuki FK, Ogara W.O. Njeruh and E.S. Mitema, 2001. Tetracycline residue levels in cattle meat from Nairobi slaughterhouse in Kenya. *Journal of Vet. Sciences*, 2: 97-101.

Murray J, Burt JR. 1969. The composition of Fish. Torry Advis. Note 38. Torry Research Station. Aberdeen.

Nouws Verdyk. 1991. Injections sites and with drawl times, *Ann.Rech.Vet*, page 145- 150.

Okolo MI. 1986. Bacterial drugs resistance in meat animal: a review *International Journal of zoo noses*, page 143-152.

Olatoye IO, Saraye TK. 2012. Oxytetracycline residues in retail chicken eggs in Ibadan, Nigeria, *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance*.

Olufemi Olatoye Isaac, Basiru Afisu. 2013. Antibiotic Usage and Oxytetracycline Residue in African Catfish (*Clarias gariepinus* in Ibadan, Nigeria). *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 5 (3): 302-309, 2013.

Ono T, Masada M, Kuroda Y, Nakagawa T. 1981. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 1344-1354.

Oxoby M. 2002. Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, page3-12.

Potil G, Caillon J, Jacqueline C, Navas D, Kergueris MF, Batard E. 2006. Pharmacocinétique et modalités d'administration desantibiotiques, page2-4. Laboratoire de

Pharmacocinétique et de Pharmacie Clinique EA 525 Université V. Segalen Bordeaux 2 et Pharmacie centrale hôpital Haut-Lévêque CHU de Bordeaux.

Pouliquen H, Le Bris. H. 2001. Residues of antibacterial drugs in foods tuff of fish origin: risk assessment, page 676-677.

Poulter NH et Nicolaides L .1985b. studies of the iced storage characteristics and composition of a variety of Bolovian freshwater fish. 2. Parana and Amazon Basins tish, J food technol.20, 451- 465p.

Poulter NH et Nicolaides L. 1985a. studies of the iced storage characteristics and composition of a variety of Bolovian freshwater fish. 1. Altiplano fish, J food technol ZO, 437- 449

Puyt JD, Guérin –Faublée V. 2006. Médicament anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie. Edition 2006, page 1-27.

Règlement (CEE) No 2377/90. 1990. Procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale, modifié par le règlement (CE) n°205/2006.JO L34.7.2.2006 p. 21 60. Règlement (CEE) No 2901/93. 1993. Modification des annexes I, II, III et IV du règlement (CEE) no 2377/90 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale

Regost C. 2001. Effets des lipides sur la qualité nutritionnelle, physique et organoleptique de la chair de la truite fario (salmo trutta) et du turbot (psetta maxima). Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1. 222p.

Rome LC, Funke RP, Alexander RM, Lutz G, Aldridge H, Scott F, Freadman M. 1988. Why animals have different muscle fibre types. Nature, 335: 824-827.

Romero R, López JC, Gómez E, Garrido A, Martínez JL. 2007. Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead seabream (*Sparus aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B, 857: 142-146.

Sanders P. 2005. Utilisation des antibiotiques en élevage et résistance. Recueil de données nationales, journées scientifiques de l'AFSSA, 16-17 /03/2005.

Schulz M, Liese AD, Mayer-Davis EJ, D'Agostino RB, Fang F, Sparks KC, Wolever TM. 2005. Nutritional correlates of dietary glycaemic index: New aspects from a population perspective. *British Journal of Nutrition* 94: 397- 406.

Schwars S, Kehrenberg C. 2004. Use of antimicrobial agents veterinary medicine and food animal production. *International of antimicrobial agent*, page 431-437.

Scippo ML. 2008. Technologie, sécurité et qualité des aliments introduction à la qualité et la sécurité des aliments : aspects chimiques. *Contrôle des résidus et des médicaments vétérinaires*, page 2-36.

Stamm C. 2005. Produits agrochimiques : Quels dangers pour le milieu aquatique?, page 3-5.

Talbert M, Willoquet G, Gervais R. 2009. *Pharmaco clinique* Wolters Kluwer France. P 641, 648,655

Tamtam F, Barbara L, Joëlle E, Fabien MA, Desportes MC. 2009. Surface water contamination by antibiotic residues in rural area, page 175–186.

Teale CJ. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain, *Journal of Applied Microbiology* 92, page 85-89.

Tenover FC, Huches JM. 1996. The challenges of emerging infectious diseases. *Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens* , page 300-304.

US- Code of Federal Regulations .1984. Part 21.556.38, Amoxicillin, U.S. Government Printing Office, Washington, DC

USDA-FSIS. 1987. in *Revised Basic Chemistry Laboratory Guidebook* (Revised March 1986; Added June 1987), No. 5.048, Science Chemistry Division, FSIS, USDA, Washington, DC.

US-Food and Drug Administration. 1986. Memorandum: General Principles for Evaluation of the Safety of Compounds Used in Food-Producing Animals, September 1986, FDA, Rockville, MD

Vandenbogaard AE. 2001. Human health aspect of antibiotic use in food animals: a review *tijdschrift voor diergeneeskunde*, page 590-595.

Yves L. 2006. Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux.

Zhang M, Su X, Mileykovskaya E, Amoscato AA, Dowhan W. 2003. Cardiolipin is not required to maintain mitochondrial DNA stability or cell.