RÈPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences biologiques et des Sciences agronomiques
Département de Biochimie Microbiologie

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du Master 2 académique en Biologie

Option : Alimentation Humaine et Qualité des Produits

Thème

Analyses physicochimiques de quelques denrées alimentaires

Réalisé par : *Melle Oubachir Kahina et Mr Mansour Karim*

Et dirigé par : Mme Salmi Djouza

Soutenu le 29/09/2015 devant le jury composé de :

Présidente : Mme SENOUSSI GHEZALI Chahra….Maitre assistante Classe A
Promotrice : Mme SALMI Djouza……Maitre assistante Classe B
Examinatrice : Mme ALMI SEBBANE……Maitre assistante Classe A
Examinatrice : Mme BIDOUHEN Samia……..Maitre assistante Classe A

Promotion 2014/2015

Remerciements

On remercie le bon dieu de nous avoir accordé la santé et les moyens de réaliser ce travail.

On tient à remercier particulièrement notre promotrice M^{me} Salmi Djouza de nous avoir encadrés, pour son soutien constant et sa persévérance pendant toute la durée de ce travail.

Nos vifs remerciements à Monsieur Mati Abderrahmane pour nous avoir ouvert les portes de son laboratoire et d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour l'élaboration de ce travail, on remercie aussi les techniciens qui ont su être patients avec nous, et nous orientés et aidés tout au long de notre expérimentation.

Nous remercions les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail, afin le perfectionner et le mettre à niveau.

A nos enseignants de département de biologie et agronomie qui nous ont suivi le long de notre cursus et nous ont permis d'accomplir notre formation

Enfin, que tous ceux et celles qui, de loin ou de prés ont contribué à la réalisation de ce mémoire, trouvent ici notre estime et sympathie ainsi que nos vifs remerciements.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

- Premièrement à mes chers parents qui m'ont toujours soutenue et aider le long de mes études quelques soit les circonstances, ma reconnaissance est immense.
- A mes frères : Said, Samir, Moussa, Mourad et Syfax. Je leurs souhaite tous chance et bonheur dans leur vie.
- A ma petite sœur Mouna. Je te souhaite tout le bonheur du monde et une bonne réussite dans tes études.
- A mes grands parents, que dieu les protègent et leurs accorde longue vie.
- A toutes ma famille, cousins, cousine. Tantes ou oncles, particulièrement mes sœurs Aini et Hannane.
- A tous mes amis sans exception et tous ceux que j'ai connu que ce soit à l'université, à la cité universitaire ou ailleurs.
- Mes spéciales dédicaces à la promotion alimentation humaine et tous notre groupe ; Ouiouiz, Souad, Moh, Loundja ; Younes, Karim, Abderezak, Tina, Farida, Samia, Hakima, Djamel, Noredine, Ouiza, Nadia et tous les autres.

Kahina.

DEDICACES

Je dédie ce travail

A tous ceux qui me sont chers

A ma chère mère qui n'a jamais cessé de prier pour moi.

A mon très chère père, que dieu les garde pour moi et ma famille.

A mes chères frères et sœurs

A mes très chers cousins

A tout ma famille

A toutes ma promotion de master 2, chacun son nom et

Spécialement à ma binôme Kahina et a touts mes amis.

MANSOUR KARIM

TABLE DES MATIERES

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux et annexes

I. Synthèse bibliographique

Introduction 3

1. Les antibiotiques et leurs résidus 4

1.1. Antibiotiques 4

1.1.1. Historique 4

1.1.2. Définition 4

1.1.3. Le mode d'action des antibiotiques 5

1.1.4. Principale familles d'antibiotiques 6

1.1.5. Principaux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire 7

1.1.6. Le métabolisme d'un antibiotique dans le corps humain 7

1.2. Résidus d'antibiotiques 8

1.2.1. Définition 8

1.2.2. Facteurs de persistance des résidus d'antibiotiques dans les denrées animalières 8

2. Utilisation des antibiotiques chez les animaux de production 9

2.1. Utilisation a titre thérapeutique 9

2.2. Utilisation métaphylactique 9

2.3. Utilisation en antibioprévention 9

2.4. Utilisation comme additif alimentaire 10

3. Toxicité et dangers des résidus d'antibiotiques 10

3.1. Risque sur la santé humaine 10

3.1.1. Les risques sur la flore digestive 10

3.1.2. Les risques d'allergie 10

3.1.3. Risque d'antibiorésistance 11

3.1.4. Risque cancérigène 11

3.2. Risques technologiques 12

4. Réglementation des résidus d'antibiotiques et la gestion de l'état du risque v lié à ces résidus 12

4.1.LMR (Limite Maximale en Résidu) 12

4.1.1.Définition de la LMR 12
4.1.2.Etablissement des LMR 12
4.2.Délai d'attente 13
4.3.Aspect législatif lié aux résidus d'antibiotiques dans les produits d'origine animale . 14
4.3.1. Réglementation en Europe 14
4.3.2. Réglementation au canada 14
4.3.3. Réglementation en Afrique 15
4.3.4. Réglementation en Algérie 15
5.Méthodes de détection des antibiotiques : 16
5.1. Les méthodes de dépistage 17
5.1.1. Tests microbiologiques 17
5.1.2. Méthodes physicochimiques 19
5.2. Méthodes de confirmation : 22
Conclusion 25
II. Partie expérimentale
Introduction 26
6. Matériels et Méthodes 27
6.1. Matériels 27
6.1.1. Matière biologique 27
6.1.2. Matériels utilisés 28
6.1.2.2. Appareillage 28
6.1.2.3. Autres 28
6.1.3. Produit chimique et réactifs 28
6.2. Méthodes expérimentales 29
6.2.1. Méthodes physicochimiques 29
6.2.1.1. Dosage de la vitamine C et évaluation de sa teneur dans différentes conditions 29
6.2.1.2. Détermination des indices d'iode et d'acide d'une matière grasse 29
6.2.1.3. Dosage des protéines par la méthode de Lowry 30
6.2.1.4. Dosage des glucides en utilisant 3.5 dinitrosalycilique (DNS) 31
6.2.2. Méthodes de séparation et de purification 32
6.2.2.1. Hydrolyse enzymatique des protéines par la papaïne 32
6.2.2.2. Chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200 33

6.2.2.3. Electrophorèse sur gel polyacrylamide 34
7. Résultats et discussion 36
7.1. Dosage de la vitamine C dans un jus d'orange et influence de quelques paramètres sur sa teneur 36
7.1.1. Teneur en vitamine C dans quelques jus commercialisés 36
7.1.2. Evolution de la teneur en vitamine C sous l'influence de la chaleur et de la lumière 37
7.1.2.1. Effet de la lumière sur la vitamine C 37
7.1.2.2. Effet de la chaleur sur la vitamine C 38
7.2. Détermination des indices d'acide et d'iode d'une matière grasse 39
7.2.1. Indice d'acide (IA) 39
7.2.2. Indice d'iode 40
7.3. Dosage des glucides dans un jus d'orange en utilisant l'acide 3.5 dinitrosalycilique (DNS) 41
7.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry 42
7.5. Isolement des séroprotéines par chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200. 43
7.6. Isolement et caractérisation electrophorétique des caséines bovine et de l'ovalbumine de l'œuf en conditions dénaturantes (PAGE SDS) après hydrolyse enzymatique par la papaïne 45
7.7. Isolement et caractérisation des séroprotéines bovines et camelines en conditions natives (PAGE native) 47
Conclusion 49
Références bibliographiques 51
ANNEXES 61

La consommation courante de produits animaliers issus d'élevage a favorisé l'emploi des médicaments vétérinaires, en particulier les médicaments anti-infectieux tels les antibiotiques. Ces derniers sont utilisés soit en tant que traitement curatif, appliquées à des animaux atteints d'affections microbiennes, soit en tant que traitement préventif pour éviter l'apparition de certaines pathologies ou encore, dans certains cas comme facteurs de croissance. Cependant ces antibiotiques peuvent se retrouver sous forme de résidus en quantité supérieure à la limite maximale de résidus (LMR) autorisé, donc être une source de nuisance pour la santé du consommateur.

L'impact de la présence de ces résidus est principalement d'ordre sanitaire mais aussi technologique pour les industries agroalimentaires de transformation. Elles présentent un risque de toxicité directe, risque allergique, risque cancérigène ainsi que des pathologies liée à la modification de la flore digestive, une résistance bactérienne est aussi envisageable et même régulière. Dans le secteur industriel, les résidus d'antibiotiques entraînent une inhibition totale ou partielle des phénomènes fermentaires d'origine bactérienne nécessaires à la fabrication des produits laitiers tels que le yaourt, les fromages et le lait caillé.

La détection des résidus d'antibiotiques est d'un grand intérêt. Elle permet de protéger l'homme contre ses effets néfaste. La détection se fait par des méthodes de dépistage notamment des méthodes microbiologiques et physico-chimiques et des moyens de confirmation par chromatographie.

Actuellement, des plans de surveillance et une réglementation en vigueur sont mis en place pour éviter d'éventuels dangers pour la santé humaine et prévoir un retrait définitif des produits animaliers susceptibles de présenter dans leurs compositions une quantité supérieure à la LMR autorisée.

Mots clés : Médicaments vétérinaires, antibiotiques, résidu, méthodes de détection, réglementation, LMR.

Abstract

Current consumption of animal husbandry products has favored the use of veterinary medicines, particularly anti-infectives such as antibiotics. These are used either as a curative treatment applied to animals with microbial diseases or as a preventive treatment to prevent the onset of certain diseases, or in some cases as growth. That during these antibiotics may be found as residues in excess of the maximum limits (MRLs) for residues permitted then must be a source of nuisance for consumer health.

The impact of the presence of these residues is mainly health but also technological for the food processing industries. They pose a risk of direct toxicity, allergic risk, cancer risk and the pathologies related to the modification of the digestive flora, bacterial resistance is also possible and even regular. In the industrial sector, antibiotic residues result in total or partial inhibition of fermentative bacterial processes needed to manufacture dairy products such as yoghurt, cheese and curd.

Detection of antibiotic residues is of great interest. It protects humans against its harmful effects. Detection is by screening methods such as: PremiTest, DelvoTest Method 4 boxes, STAR method (Screening Test Antibiotic residues) and biochemical confirmatory methods (mass spectrometry) and electrophoretic (HPLC).

Currently, monitoring plans and existing regulations are in place to avoid possible dangers to human health and provides for a final withdrawal of animal products may present in their composition in an amount such residues.

During this, the problem of waste is not restricted to the simple management of veterinary drugs but also the obligation to respect two important concepts namely FSD (No Effect Dose) and the MRL (Maximum Residue Limit).

Keywords: Veterinary drugs, antibiotics, residue, methods of detection, regulation, MRLs.

Liste des abréviations

ACIA : Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ARN : Acide ribonucléique

BSA : Albumine sérique bovine

CCM : chromatographie sur couche mince

CMA : Concentration Minimale Antibactérienne

CEE : Communauté Economique Européenne

DCPIP : dichlorophénol indophénol

DO : densité optique

DJA : Dose Journalière Admissible

DSE : Dose Sans Effet

DNS : acide dinitrosalysilique

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FAO: Food and Agriculture Organization

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IA : indice d'acide

Ii : indice d'iode

Kg : kilogramme

LABAB : Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies

LMR : Limite Maximale des Résidus

m : masse

min: minute

mg: milligramme

N : normalité

OMC : Organisation Mondiale du Commerce

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PET : polytéréphtalate d'éthylène

pH : potentiel d'Hydrogène

pM : poids moléculaire

ppm : partie par million

SDS : dodécyle sulfate de sodium

SC : Santé Canada

SM : Spectrophotométrie de Masse

TCA : acide trichloroacétique

TEMED : tétraméthyléthylènediamine

UE: Union Européennes

USA: United States of America

LISTE DES FIGURES

N° DE FIGURE	INTITULE	PAGE
01	Expression des résultats de Delvotest SP.	**16**
02	Test et interprétation des résultats (Valio T101)	**16**
03	Schéma de principe du PENZYM TEST	**18**
04	Principe de réaction du ß-STAR	**19**
05	Interprétation des résultats du ß-STAR	**19**
06	Principe de Charm test	**20**
07	instrumentation de l'HPLC	**21**
08	Schéma de principe de base d'une SM	**22**
09	Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de Lowry et *al* (1951) réalisée avec le Sérum Albumine Bovine (BSA) comme protéine de référence.	**29**
10	Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs	**29**
11	Courbe étalon des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.	**30**
12	Photographie d'une unité de chromatographie basse pression (LABAB UMMTO)	**31**
13	Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260)	**33**
14	Evolution de la teneur en vitamine C selon l'intensité de la lumière	**35**
15	histogramme représentatif d'indices d'acide des différents corps gras analysés	**37**
16	Histogramme représentatif d'indice d'iode des différents corps gras analysés	**38**
17	comparaison de la teneur en glucide dans les jus de fruit analysés	**39**
18	Chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur gel SEPHACRYL S200.	**42**
19	Chromatogramme des protéines sériques du lait de chamelle sur gel SEPHACRYL S200.	**42**
20	Profils electrophorétique des hydrolysats (caséines lyophilisées du lait de vache et de l'ovalbumine de l'œuf) en PAGE SDS	**43**
21	Electrophorégramme des séroprotéines bovines et camelines en PAGE NATIVE	**45**

LISTE DES TABLEAUX

N° DU TABLEAU	TITRE DU TABLEAU	PAGE
I	Principales familles d'antibiotiques et leur caractéristique.	**3**
II	Evolution des méthodes de détection dans de temps	**4**
III	Seuils de détectabilité des principales familles d'antibiotiques par le Premi Test par rapport aux LMRs dans le muscle	**11**
IV	Exemples de LMR du lait en Europe, aux États Unis et dans le codex Alimentarius (exprimées en µg/kg ou ppm)	**14**
V	Les teneurs en vitamine C dans quelques jus commercialisée et leurs pH.	**15**
VI	Evolution de la teneur en vitamine C selon la température.	**34**
VII	Comparaison de la teneur en protéines dans le lait de vache et le jus lacté (Sommam).	**36**
VIII	Comparaison de la teneur en protéines dans les échantillons analysés.	**40**

LISTE DES ANNXES

N° D'ANNEXE	INTITULE	PAGE
01	Dosage de la teneur en vitamine C dans certains jus commercialisés.	**58**
02	Détermination de l'indice d'acide dans une matière grasse	**59**
03	Détermination d'indice d'iode dans une matière grasse	**59**
04	Dosage des glucides avec l'acide 3.5 dinitrosalycilique (DNS)	**61**
05	Dosage des protéines par la méthode de Lowry	**61**
06	L'électrophorèse sur gel polyacrylamide	**63**
07	Hydrolyse enzymatique	**67**
08	limite maximales des résidus (LMR) des principaux antibiotiques (µg/kg ou ppm)	**67**
09	les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200 (protéine de chamelle).	**68**
10	les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de perméation sur gel de SYPHACRYL S200 (protéines bovins).	**68**

Introduction

Satisfaire les besoins alimentaires d'une population mondiale qui ne cesse de croître devient un problème de plus en plus aigu. A cette fin l'homme a cherché à augmenter le rendement de production pour atteindre un équilibre alimentaire adéquat en se basant sur l'utilisation de certains antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'élevage mais cela sans entraîner une quelconque présence de résidus.

En effet, La mauvaise utilisation de ces antibiotiques par les éleveurs et les vétérinaires ainsi que le non respect des délais d'attente et le non contrôle des LMR après le traitement des animaux conduisent à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, par conséquent, il constitue un facteur limitant pour les industries agroalimentaires parce qu'ils inhibent les différents processus de fermentation , en plus du fait qu'ils sont à l'origine de potentiels risques toxicologiques pour le consommateur et aussi le développement de bactéries résistantes.

L'Union Européenne, l'USA et le canada, de leur réglementation sur les résidus d'antibiotiques ont plusieurs points d'avance sur le reste des états du monde, les études qu'ils ont réalisé en cet objet affirment inlassablement que les résidus doit être rigoureusement contrôlées. L'Algérie considéré comme pays du tiers monde reste largement en arrière en matière de ces évolutions scientifiques et réglementaires d'où la nécessité d'avoir de l'égard pour ce domaine précisément et de fournir des efforts pour limiter les risques sur la santé publique.

Dans cette partie nous allons réunir des données bibliographiques concernant les principales familles d'antibiotiques, les problèmes causés par les résidus d'antibiotiques, les méthodes de détection couramment utilisées pour leur recherche. En outre, on va souligner l'importance du respect de la réglementation et des recommandations des services spécialisés dans ce cadre.

1. Les antibiotiques et leurs résidus

1.1. Antibiotiques

1.1.1. Historique

Les premières observations d'antibiose remontent à 1877, à cette époque la, Pasteur et Joubert ont constaté que des bactéries communes (aérobie) inhibent la croissance de *Bacillus anthracis* (ASSELINEAU *et al*, 1973). Mais il faut attendre les travaux de sir Alexandre FLEMING à la fin de l'année 1920 pour que la pénicilline fasse son entrée dans la pharmacopée occidentale (WILLEM, 2012).

En Septembre 1928, alors qu'il cultivait une souche de Staphylocoques, il y remarqua la présence de moisissures. Il réalisa par la suite que les colonies de Staphylocoques étaient lysées, autrement dits détruites. Le filtrat isolé de *Penicillium* fut appelé la pénicilline, puis en 1939, Howard WALTER FLOREY et Ernest BORIS CHAIN, réussirent à isoler l'agent actif de la pénicilline. Tout ce travail fut publié en 1929 et en 1945, les deux découvertes ont eu le mérite d'un prix Nobel (WILLEM, 2012).

Deux autres dates importantes marquent encore le début de l'histoire des antibiotiques. L'année 1939, lorsque DUBOS a montré la présence dans le sol de microorganismes producteurs d'antibiotiques (*Bacillus brevis* produisant la thyrothicine) ; et 1944, lorsque WAKSMAN et SCHARTZ ont découvert la streptomycine, ouvrant la voie aux autres antibiotiques d'actinomycètes (ASSELINEAU *et al*, 1973).

1.1.2. Définition

En 1942, WAKSMAN définit un antibiotique comme un dérivé produit par le métabolisme des microorganismes possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cette notion a été étendue aux molécules obtenue par hémysynthèse (BRYSKIER, 1999).

Une telle définition s'est révélée trop restrictive car de nombreuses molécules obtenues par synthèse chimique ont également une activité sur les microorganismes (LARPENT, 1989).

Un antibiotique est donc actuellement défini comme une substance d'origine biologique ou synthétique, agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries ou des champignons (BERCHE, 1991).

1.1.3. Le mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont un impact bien précis au niveau de la cellule bactérienne. Ils peuvent ainsi toucher soit la structure, soit la fonction d'une bactérie, agissant soit par toxicité sélective, soit par phénomène d'inhibition compétitive. Cette action se déroule a l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques de la vie de la bactérie (KEZZAL, 1993).

Connaissent actuellement quatre principales cibles, nous verrons successivement le mode d'action des antibiotiques sur la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, les acides nucléiques et le ribosome (synthèse des protéines).

TABLEAU I : tableau présente le site et mode d'action de quelques antibiotiques (OXOBY, 2002).

Les antibiotiques	Le site d'action	Le mode d'action d'antibiotique
Vancomycine Teicoplanine Fosfomycine Benzyl Pénicilline Clométocilline Oxacilline	La paroi bactérienne	Inhibition la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne.
Polymixine colistine	La membrane cytoplasmique	Désorganisation de la sa structure et du fonctionnement de la membrane, ils agissent comme des agents tensio-actifs, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.
Tetracyclines Phénicolés Oxazolidinones Aminosides	Sur les ribosomes	Entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales et des erreurs de lecteur de code génétique lors de la traduction des protéines.
Quinolones Fluoroquinolone Nitrofuranes Rifamycines	Sur l'acide nucléique(ADN)	Ils empêchent la réplication de l'ADN aussi leur transcription en ARNm agissant sur l'ARN polymérase et autre enzymes de l'inhibition de la biosynthèse protéique

1.1.4. Principale familles d'antibiotiques

La classification par famille est la classification la plus courante, possédant un certains nombre de caractères communs : composition chimique ou origine, spectre d'action similaire ou très rapproché, cibles bactériennes identiques, résistance bactérienne et sensibilisation croisée, effets indésirables rapprochés, etc. (DUVAL ET SOUSSY, 1990). Le tableau suivant représente les principales familles d'antibiotique et leur caractéristique.

TABLEAU II: classification de quelques familles d'antibiotiques et leurs caractéristiques (GOGNY ET PUYT, 2001).

Famille d'antibiotiques	Caractéristiques
Bêtalactamines	Bactéricides, actifs par voie orale, caractérisé par une forte élimination urinaire.
Aminosides	Bactéricides, inactive sur les bactéries anaérobie, spectre d'activité large, résorbé par vois digestif à distribution extracellulaire et élimination urinaire.
Tétracycline	Bactériostatiques, spectre d'activité large, résorbé par vois digestif.
Phénicolés	Bactériostatiques, large spectre d'activité, résorbé par voie digestive a large diffusion dans l'organisme.
Diamino-pyrimidines	Antibactériens bactériostatique a large spectre d'activité résorbés par voie orale et présentant une distribution intracellulaire.
Quinolones	Antibactériens bactéricides, inactive sur les bactéries anaérobie.
Nitrofuranes	Bactériostatiques à spectre d'activité large tous interdits chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR.
Hydroxy-quinoléines	Bactériostatiques à spectre d'activité large (bactéries a gram – et +), protozoaires, certains champignons, utilisés essentiellement en antisepsie.
Quinoxaline N-adioxydes	Facteurs de croissance à large spectre antibactériens utilisés uniquement en tant qu'additifs.

1.1.5. Principaux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire

Les antibiotiques sont important pour l'élevage parce qu'ils sont significatif pour améliorer la croissance lorsqu'ils sont ajouté à l'alimentation animale (CONSUELO *et al*, 2010). Ils sont aussi, dans d'autres cas indispensable pour le maintien d'un cheptel en bonne santé et éviter des pertes économiques considérables.

Plusieurs familles d'antibiotiques sont utilisées dans la médecine vétérinaire :

- β-lactamines (pénicillines et céphalosporines)
- Les tetracyclines ;
- Chloramphénicols ;
- Macrolides ;
- Les septinomycines ;
- Lincosamides ;
- Sulfamides ;
- Les nitrofuranes ;
- Les nitromidazoles ;
- Les triméthoprime ;

- Les polymyxines ;
- Les quinolones ;
- Les macrolides (ansamycines, glycopeptides et aminosides).

1.1.6. Le métabolisme d'un antibiotique dans le corps humain

Après ingestion d'une denrée alimentaire contenant une dose d'antibiotique, ce dernier est entrainé dans l'organisme et diffuse en poursuivant une trajectoire précise, subissant, par la suite un grand nombre de réactions biologique dans différents organes du corps humain qui à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration (GUILLEMOT, 2006). Certaines classes d'antibiotiques ont une bonne absorption digestive (macrolides, tetracyclines, et sulfamides). Pour d'autres classe (aminosides, polypeptides), l'absorption est nulle et la voie injectable est nécessaire pour obtenir un effet systémique (ZEGHILET, 2009).

Une fois, la circulation générale de l'AB atteinte, il est réparti dans l'ensemble des tissus et organes. Cette distribution dépend essentiellement des liaisons de celui-ci aux protéines tissulaires, de l'irrigation des organes et des barrières que l'organisme met en œuvre pour se protéger. Un antibiotique sera mieux distribué s'il est faiblement lié aux protéines plasmatiques, s'il a une forte affinité pour les protéines tissulaires, et si les tissus et organes concernés sont bien perfusés (BOUSQUET-MELOU et TOUTAIN.2004).

Au sein des tissus, l'AB subit une série de biotransformation qui est un ensemble de réactions chimiques, en général catalysées par des enzymes, ayant pour effet de modifier la structure des principes actifs. On observe par exemple des oxydations, des hydroxylations, des réductions ou des hydrolyses (STOLTZ, 2008).
Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs au plan de l'activité antimicrobienne tandis que d'autres sont peu métabolisées ou que le métabolisme conduit à des métabolites actifs au plan microbiologique (GUILLEMOT, 2006). En d'autres termes les biotransformations peuvent conduire à une inactivation et une détoxication des principes actifs vis à vis de l'organisme ou au contraire à un processus d'activation.
Cette étape représente un phénomène majeur dans le processus de formation des résidus ; elles conditionnent en effet en grande partie la persistance des substances médicamenteuses dans l'organisme des animaux traités (et dans les denrées issues de ces animaux), la nature des résidus et leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques.

Enfin du processus, le médicament est éliminé soit par voie rénale (dans les urines), soit par voie biliaire (dans les matières fécale), soit dans les œufs, ou bien par élimination lactée dans le lait (STOLTZ, 2008).

1.2. Résidus d'antibiotiques

1.2.1. Définition

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux d'antibiotiques reçus par l'animal de son vivant. La définition de résidus est codifiée dans une directive européenne comme étant « tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux » (STOLTZ, 2008).

1.2.2. Facteurs de persistance des résidus d'antibiotiques dans les denrées animalières

L'accès à un arsenal thérapeutique proposé par l'industrie pharmaceutique, l'usage croissant de produits antiparasitaires et des antibiotiques pour prévenir et traiter les maladies accroissent la probabilité d'une présence de résidus de ces substances dans les produits d'origine animale. Les facteurs favorisant la présence de ces résidus dans les aliments d'origine animale sont, entre autres, le non-respect des délais d'attente après l'administration des antibiotiques, la non-consultation des vétérinaires avant l'utilisation d'antibiotiques, l'absence de formation préalable en production animale et le type d'élevage intensif ou extensif, pratiqué par l'exploitation (MENSAH, 2010). Selon CHATAIGNER et STEVENS (2005) la persistance de résidus varie selon plusieurs facteurs qui sont:

- ✓ l'antibiotique lui-même ;
- ✓ la forme pharmaceutique ;
- ✓ les modalités d'injection ;
- ✓ le site d'injection ;
- ✓ la dose injectée ;
- ✓ la sévérité de l'irritation locale ;
- ✓ les facteurs liés à l'animal.

2. Utilisation des antibiotiques chez les animaux de production

Selon la réglementation de l'UE, les antibiotiques, les médicaments vétérinaires sont soumis à une prescription vétérinaire. La délivrance du médicament peut s'effectuer selon différentes modalités en fonction des États membres (BOUSQUET-MELOU *et al*, 2011).

Les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre manières différentes, et visent plusieurs objectifs pour avoir un rendement satisfaisant (SCHWARZ et KEHRENBERG, 2001).

2.1. Utilisation a titre thérapeutique

L'usage curatif ou thérapeutique, consiste à traiter individuellement les animaux qui présentent des signes cliniques d'infection. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison de ces

animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. En général le traitement est individuel et il est mis en œuvre chez animaux de rentes (vaches laitières, …). Le plus souvent, le traitement en antibiotique est donné par voie orale ou par voie parentérale (PHILLIPS *et al*, 2004).

2.2. Utilisation métaphylactique

Lorsqu'une infection contagieuse se déclare chez quelques animaux dans un élevage à grand effectif, l'ensemble du groupe est traité, c'est ce qu'on appelle la métaphylaxie ou prévention en milieu infecté. Cet usage permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse, alors qu'ils sont encore en phase d'incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes. La métaphylaxie est généralement mise en œuvre à partir d'un seuil d'atteinte des animaux au sein du lot de 10-15% de l'effectif (KESTEMAN, 2009).

2.3. Utilisation en antibioprévention

Les antibiotiques peuvent, parfois, être administrés à des périodes critiques de la vie, d'animaux soumis a une pression de contamination régulière et bien connue, après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire. Dans ces conditions, on parle d'antibioprévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique (DANAN, 2006).

2.4. Utilisation comme additif alimentaire

Les antibiotiques administrés à de faibles doses dans l'alimentation animale modifient la composition de la microflore intestinale entrainant une meilleure assimilation des aliments par les animaux (SANDERS, 2005). Les antibiotiques peuvent être ainsi utilisés comme facteur de croissance en vue d'améliorer les performances des animaux, sans que les mécanismes à l'origine de cette amélioration n'aient été clairement élucidés (DINBER et RICHARDS, 2005).

3. Toxicité et dangers des résidus d'antibiotiques

La présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires est très dangereuse au même titre que celle de tout autre produit chimique. La toxicité par les résidus d'antibiotiques est assez difficile à mettre en évidence car il s'agit en générale d'une toxicité chronique. Cette toxicité ne s'exprime qu'après consommation répétée de denrées alimentaires contenant des résidus du même antibiotique c'est-à-dire qu'après absorption répétée de nombreuse dose toxiques (JEON et al, 2008).

Certains scientifiques ont évoqué des risques de troubles hépatiques et rénaux provoqués par les tetracyclines et les macrolides, une possible apparition d'anémie due à la prise de chloraméphénicol a également été mentionnée (STOLTZ, 2008). S'ajoute à ça l'existence de risque d'allergie, d'antibiorésistance ainsi qu'un risque technologique empêchant la transformation microbiologique de la denrée alimentaire contenant le résidu.

3.1. Risque sur la santé humaine

3.1.1. Les risques sur la flore digestive

Dans le tube digestif vivent des milliards de bactéries saprophytes et commensales surtout des bactéries anaérobies, bactéroïdes et fusobactérium (PERSON, 1981). Les résidus d'antibiotiques peuvent perturber cette flore intestinale humaine.

En effet, même à très faibles doses les antibiotiques ingérés ont un impact sur l'écologie de la flore intestinale comme cela a été montré in vitro (CARMAN et *al*, 2001) et in vivo (BARTHOLOMEN *et al*, 2006 ; BOISSEAU *et al*, 2001), ce qui peut comporter certains risques pour la santé humaine. Selon EDLUND *et al* (2000) les effets observés chez l'hôte sont :

- l'élimination des bactéries de la microflore intestinale, sensibles aux concentrations actives de l'antibiotique.
- la sélection et la prolifération de bactéries résistantes au sein de la flore endogène conduisant à une colonisation du tractus digestif par des micro-organismes exogènes résistants.

3.1.2. Les risques d'allergie

Le risque médical le plus sérieux en matière de résidus de médicaments vétérinaires, concerne les accidents d'allergie provoqués essentiellement par les pénicillines et les tétracyclines (LABIE C, 1981).

Les taux résiduels d'antibiotiques dans le lait sont suffisants pour déclencher une crise allergique, rarement de type « choc anaphylactique »gravissime chez les sujets préalablement sensibilisés. Outre ces phénomènes d'allergie, des cas mortels d'aplasie médullaire sont signalés avec le chloramphénicol (GOGNY M *et al*, 1999 ; MILHAUD G.1985).

Cependant, Les réactions allergiques de type III caractérisées par des réactions de type fièvre induite, un syndrome « maladie du sérum » ainsi que par la possibilité de rash érythémateux, sont les plus fréquentes dans les cas d'exposition aux résidus (NISHA, 2008). Et ce sont surtout les résidus de pénicilline qui sont indexés (les acides pénicilloïque, pénicillénique, pénalmaldique, pénicillényls et les pénicillamines) (DEMOLY *et al*. 2000).

3.1.3. Risque d'antibiorésistance

Au cours des deux dernières décennies, les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont devenus un sérieux problème de santé publique. Une des raisons de l'augmentation de cette résistance pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale (GYSI, 2006).

Il existe deux types de résistances aux antibiotiques une résistance naturelle et une résistance acquises Ainsi, la résistance naturelle peut être comprise comme étant une insensibilité aux antibiotiques, faisant partie du matériel génétique propre à un genre ou à une espèce bactérienne. La résistance acquise représente, quant à elle, l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre le germe insensible à une molécule ou à un groupe de molécules.

La résistance inclut trois types de mécanismes : modification de la cible de l'antibiotique, synthèse d'enzymes capables d'inactiver les antibiotiques ou diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques (ROMNEE, 2008).

La détermination du rôle des résidus d'antibiotiques dans le développement et la dissémination de résistances bactériennes chez l'homme ainsi que la détermination d'une dose microbiologiquement sans effet, est difficile (STOLTZ, 2008).

3.1.4. Risque cancérigène

Certains antibiotiques ont des propriétés carcinogènes connues. Les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir un effet carcinogène sur le long terme, suite à une consommation Régulière d'aliments contenant ces résidus. Grace à ces effets, ils sont alors interdits chez les animaux de production.

On prend par exemple le cas des nitrofuranes, qui sont des antibiotiques bien connue de leur effet cancérigène génotoxiques. Des études ont montré que leur utilisation prolongée pouvait être à l'origine de modifications du matériel génétique et de l'apparition de tumeurs. Le pouvoir mutagène et le pouvoir carcinogène de ces composés proviennent de la nitro-réduction du médicament, conduisant à la formation de métabolites électrophiles et à leur fixation à l'ADN.

Ces composés sont rapidement métabolisés dans l'organisme et leur stabilité *in vivo* n'excède pas quelques heures. Ainsi, la majeure partie des résidus de nitrofuranes dans les denrées alimentaires sont liés aux protéines, principalement de manière covalente (LEITNER *et al*, 2001), leur pouvoir cancérigène est alors annihilé (BERNARD, 2003).

3.2. Risques technologiques

Du point de vue technologie laitière, les résidus d'antibiotiques entraînent une inhibition totale ou partielle des phénomènes fermentaires d'origine bactérienne nécessaires à la fabrication des produits laitiers tels que le yaourt, les fromages et le lait caillé. Parmi les molécules impliquées dans cette inhibition des germes fermentaires, il y a les pénicillines, la streptomycine, le chloramphénicol et les Tétracyclines (ZEIL, 1988). Selon SCIPPO (2008) la présence d'antibiotiques dans la viande, entraîne des accidents de fabrication du salami et autres produits de fermentation de la viande.

4. Réglementation des résidus d'antibiotiques et la gestion de l'état du risque v lié à ces résidus

Au plan international, pour maîtriser les risques liés aux résidus et protéger les consommateurs, une commission mixte FAO/OMS, le Codex Alimentarius, sont chargée d'élaborer des normes alimentaires, des directives et d'autres textes tels que les codes d'usage**.** Cette commission fixe les limites maximales de résidus (LMR) pour chaque produit. Dans les pays du Nord (Europe, USA, canada), les normes du Codex Alimentarius ont été mises en application et même rendues plus strictes dans certains cas.

En effet, les règles de l'OMC se basent sur les normes sanitaires et phytosanitaires des produits alimentaires. Pour faciliter les pratiques loyales en matière commerciale, la Commission du Codex Alimentarius au travers son comité sur les résidus de médicaments

vétérinaires et son comité d'experts sur les additifs alimentaires, fixent les LMR qui doivent garantir la santé du consommateur (ABIOLA et *al*. 2005).

4.1. LMR (Limite Maximale en Résidu)

4.1.1. Définition de la LMR

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

4.1.2. Etablissement des LMR

La fixation des LMR est obligatoire pour tous les principes actifs qui entrent dans les médicaments administrés aux animaux de production. Elle signifie que le potentiel toxique du médicament est parfaitement connu et que le consommateur n'encourt aucun risque si les LMR ne sont pas dépassées (BOULTIF, 2009). L'établissement des LMR suit une procédure définie dans le Règlement européen 2377/90/CEE du conseil du 26 juin 1990. Pour une substance pharmacologiquement active, (principe actif ou ingrédient de médicament), une évaluation de sa toxicité et de ses effets pharmacologiques est réalisée à partir d'études dont les principes sont définis dans des lignes directrices ou Guidelines européennes (LAURENTIE, SANDERS, 2002). L'industriel monte un dossier présentant les études réalisées et proposant une LMR pour chaque espèce de destination, au vu du résultat des études.

Les résultats des études pharmacologiques et de toxicité permettent de déterminer une Dose Sans Effet (DSE), c'est-à-dire une dose qui ne montre pas d'effets toxicologiques ou pharmacologiques dans les différentes études. Ensuite, cette DSE est divisée par un facteur de sécurité (100 à 1000) selon le profil toxicologique de la molécule pour aboutir à la Dose Journalière Admissible (DJA) (LAURENTIE *et al*, 2002).

Il ne faut pas confondre CMA et LMR. En effet, la CMA se rapporte à la concentration totale tolérable en résidus. La LMR, par contre, se rapporte à un résidu marqueur, représentatif de cette CMA. La détermination de la LMR permet ensuite de définir la période de retrait de la production agricole : il s'agit de la période pendant laquelle la teneur en résidu est supérieure à la LMR. Pendant cette période, le tissu animal destiné à la consommation humaine (viande, lait, …) ne peut donc être mis sur le marché (ROMNEE, 2006).

Tableau III: Exemples de LMR du lait en Europe, aux États Unis et dans le codex Alimentarius (exprimées en µg/kg ou ppm) (FABRE *et al*, 2006)

Famille d'antibiotique	**Molécule**	**Lait**		
		LMR Europe	**LMR Codex**	**LMR USA**
Bêtalactamine	Pénicilline G	4	4	5
	Ampicilline	4		10
	Cloxacilline	30		10
	Oxacilline	30		50
	Céphaléxine	100		
	Céfalonium	20		
Aminoglycosides	Néomycine	1500	500	150
	Gentamicine	100	200	30
	Streptomycine	200	200	125
	Oxytétracycline	100	100	300
	Chlortétracycline	100	100	300
Macrolides	Spiramycine	200	100/200	
	Tylosine	50		50

4.2. Délai d'attente

Le temps d'attente est définit dans la directive européenne 81/851/CEE, comme suit « délai entre la dernière administration de la spécialité à des animaux sous les conditions normales d'emploi et la production de denrées alimentaires issues de ces animaux, afin de garantir que ces denrées ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux LMR » (LAURENTIE, SANDERS, 2002).

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

Le respect de ce temps d'attente permet de commercialiser les denrées qui présentent des concentrations inférieures ou proches de la limite maximale des résidus garantissant la protection de la santé du consommateur (ABIDI, 2004).

Dans la filière du lait, le temps d'attente était exprimé sous forme d'un nombre de traite à éliminer avant de pouvoir commercialiser le lait.

Actuellement, compte tenu des différents types de traites rencontrées, le temps d'attente est exprimé en multiple de 12 heures, par conséquent, il est exprimé en heures ou en jours éventuellement (BOULTIF, 2009).

4.3. Aspect législatif lié aux résidus d'antibiotiques dans les produits d'origine animale

4.3.1. Réglementation en Europe

La problématique des résidus ne se limite cependant pas à la gestion simple des médicaments à usage vétérinaire. En effet, le législateur prévoit de protéger la santé du consommateur par le biais de LMR implémentées sur les aliments d'origine animale. Ainsi,

les aliments obtenus à partir d'animaux traités avec des médicaments vétérinaires ne peuvent contenir des résidus qui représentent un danger pour la santé publique. (ROMNEE, 2006)

Une tolérance zéro est appliquée à dix résidus interdits à l'intérieur de l'union européenne dont le chloramphénicol, les nitrofuranes, les nitromidazoles, les dimetridazoles, les metronidazoles et les ronidazoles. (GATERMANN et BRUNS, 2004).

Selon ROMNEE (2007), le règlement CEE n° 2377/90 de la communauté européenne définit des LMR et comporte quatre annexes :

- annexe I : substances à LMR définitive :
- annexe II : substances sans risques (LMR inutile) ;
- annexe III : substances à LMR provisoire :
- annexe IV : substances interdites (risque pour le consommateur).

4.3.2. Réglementation au canada

Au Canada, deux agences gouvernementales fédérales sont chargées de l'application de la réglementation concernant les médicaments utilisés en production animale et particulièrement les antibiotiques et substances hormonales :

- Santé Canada (SC) est responsable de fixer les normes et les politiques de salubrité alimentaire et de nutrition, telles que définies dans la loi sur les aliments et drogues et son règlement.
- L'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) veille à l'application de ces normes et politiques.

Les Limites Maximale des Résidus (LMR) sont fixés par Santé Canada dans le « Règlement sur les aliments et drogues »

Selon Santé Canada Les LMRs pour les viandes sont indiquées au titre 1S, article B.15.001 à B.15.003, et figurent dans les tableaux qui s'y rattachent. Le premier tableau traite des métaux, le deuxième tableau des produits chimiques agricole, et le troisième tableau des médicaments vétérinaires.

L'article B.01.048 du règlement sur les aliments et drogues interdit la vente d'animaux destinés à la consommation qui ont été traités avec certains médicaments, dont :

- Le chloraméphénicol, ses sels et ses dérivés ;
- Un composé de S-nitrofurane ;
- Le clenbuterol ;
- Un composé de 5-nitro-imidazole ;
- Le diéthylstilbesterol et autres composé de stilibène.

4.3.3. Réglementation en Afrique

Au niveau Africain, le Botswana est l'un des pionniers en matière de législation sur les résidus. L'Afrique du Sud, le Maroc et la Zambie ont entrepris une démarche de mise à niveau pour les exigences de la communauté Economique Européenne. Pour le Maroc par exemple, son objectif est d'avoir des produits compétitifs sur le marché européen.

Au Sénégal, à notre connaissance, en dehors des initiatives prises par certains exportateurs dans le simple but de satisfaire à l'éligibilité de leurs produits sur le marché d'exportation, il n'y a pas de réglementation en matière de résidus de médicaments vétérinaires et des autres

substances chimiques. Ce vide juridique expose le consommateur sénégalais aux risques éventuels que peuvent engendrer ces résidus (IMAO, 1998).

4.3.4. Réglementation en Algérie

La législation algérienne dans sa définition du lait, dans l'article 6 de l'arrêté interministériel (le ministère de l'économie, le ministère de l'agriculture et le ministère de la santé et de la population) du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation, mentionne le fait qu'un lait propre à la consommation humaine ne doit pas contenir des résidus d'antibiotiques mais ne précise pas explicitement des limites maximales de résidus (BOULTIF, 2009).

En dépit du fait que plusieurs denrées alimentaires or le lait sont touchées par les risques de résidus d'antibiotiques, aucune loi ni réglementation n'est implantées à cet égard, et les phénomènes indésirables perpétuent à l'insouciance de l'état

5. Méthodes de détection des antibiotiques :

L'utilisation massive d'antibiotiques a déclenchée le développement de bactéries résistantes qui au cours de ces dernières années et est devenue une préoccupation mondiale par conséquent la législation impose le contrôle de résidus d'antibiotiques dans les animaux vivants et les produits d'origine animale et des LMR ont été établi pour différentes matrices (CONSUELO *et al*, 2010). Selon SCIPPO (2008), le contrôle de ces résidus dans les denrées alimentaires est indispensable pour garantir :

- La protection de la santé publique ;
- Le respect des règles qui régissent le commerce ;
- La production de matière première de qualité pour les industries agroalimentaires.

Le tableau III illustre les dates importantes dans le développement des méthodes de détection des résidus d'antibiotiques.

TABLEAU IV: Evolution des méthodes de détection dans de temps (ROMNEE, 2007).

Année	**Événements**
1952	Développement d'un test de recherche des inhibiteurs dans le lait : *Bacillus subtilis*
1961	Développement du Br Test utilisant *Bacillus stearothermophilus*
1975	Développement du Delvotest SP utilisant *Bacillus stearothermophilus*
1978	Développement du Penzym - test enzymatique
1991	Proposition d'une méthode de détection utilisant *Bacillus steathermophilus* décision (91/180/CEE)
1994	Passage à la méthode de diffusion en tube
2000	Uniformisation : Delvotest MCS sur toutes les livraisons
2004	Abandon de la lecture visuelle au profit de la lecture réflectométrique
2005	Utilisation du Copan Milk Test
2007	Modification des méthodes de confirmation

La stratégie de contrôle des résidus est en général basée sur une approche en deux étapes : l'étape de la détection des résidus avec des méthodes sensibles et l'étape de confirmation nécessitant une quantification par rapport à la LMR (MENSAH *et al*, 2014).

5.1. Les méthodes de dépistage

Les méthodes de dépistage sont des méthodes qualitatives qui ont pour but de discerner les échantillons positifs des échantillons négatifs. Ces contrôles sont basés sur l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Les échantillons conformes sont acceptés tandis que ceux suspectés d'être non-conformes doivent être confirmés à l'aide de méthodes de confirmation. (STOLTZ, 2008). Elles doivent fournir un faible taux de faux résultats, une facilité d'utilisation, l'analyse à court temps, une bonne sélectivité et à faible cout (ZANETA *et al*, 2011)

Deux types de tests sont utilisés pour rechercher les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale en France :

- Des tests microbiologiques qui utilisent le principe de la croissance bactérienne ; ce sont des méthodes bactériennes encore appelées méthodes d'inhibition ;

- Des tests qui utilisent des méthodes physico-chimiques, tel que la chromatographie en couche mince, la chromatographie en phase liquide ou la chromatographie en phase gazeuse et des techniques enzymatiques ou immunologiques (FERGUSSON *et al*, 2002).

5.1.1. Tests microbiologiques

Ils présentent quelques avantages qui leur permettent d'être fréquemment utilisés comme méthode de screening .En effet, simples et facilement automatisable, ils ne nécessitent qu'un équipement réduit, ils sont aussi peu onéreux, leur sensibilité permet la détection d'un nombre élevé de molécules, cependant, sans avoir d'information sur la nature et la concentration de l'inhibiteur présent.

❖ **Premi Test :**

C'est un test de détection mis au point pour la détection des résidus d'antibiotiques, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs. L'échantillon est laissé à diffuser dans une ampoule contenant un milieu gélosé ensemencé par des spores de *Bacillus stearothermophilus* avec un indicateur de pH. Après incubation, la croissance normale des micro-organismes provoque l'acidification du milieu ce qui change la couleur de l'indicateur de pH du violet vers le jaune. En présence de substances inhibitrices (résidus d'antibiotiques), la couleur du milieu reste violette après incubation, l'échantillon est rapporté comme étant positif, et si la couleur du milieu vire au jaune l'échantillon est considéré comme étant négatif. (SCIPPO et al, 2006). Le Premi Test est un test rapide, sensible qui donne un résultat fiable en moins de quatre heures, prêt à l'emploi et d'un bon rapport coût/performance. (ZEGHILET, 2009)
Depuis 2006, il est reconnu comme une méthode officielle dans de nombreux pays comme la France, et est validée par l'Agence Française de Normalisation (AFNOR, 2006).

TABLEAU V: Seuils de détectabilité des principales familles d'antibiotiques par le Premi Test par rapport aux LMRs dans le muscle (AFNOR, 2006).

Famille	**Sulfamide**	**Tétracycline**	**Macrolide**	**β-lactamine**	**Aminosides**
Antibiotique	Sulfadiméra zine	Oxytétracyc line	Tylosine	Amoxycilli ne	Gentamycine
LMR (muscle) (µg/kg)	100	100	100	50	50
Limite de détection	2 x LMR	2 x LMR	LMR	0.5 x LMR	>2 x LMR

❖ **Delvotest SP :**

C'est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de détecter les résidus de substances infectieuses dans le lait (SCIPPO, 2006).

Il est particulièrement sensible vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines et des sulfamides. (BOULTIF, 2009) Le principal inconvénient de ce test est sa durée d'incubation 2h30 (BROUILLET, 2002).

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

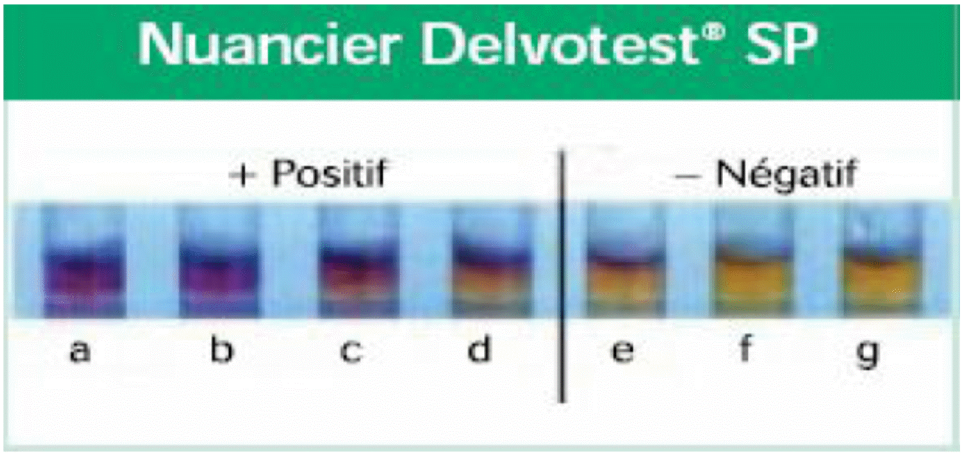
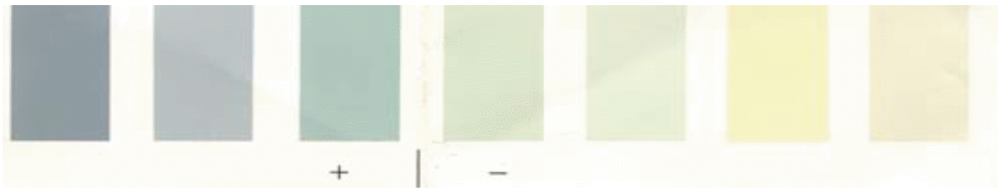


Figure 01: Expression des résultats de Delvotest SP (Reybroeck, 2004)

❖ **Valio 101**

Tout comme le Delvotest, le Valio T101 est un test microbiologique basé sur l'aptitude que présentent certaines bactéries à produire de l'acide lactique en l'absence d'agent inhibiteur. L'acidification du milieu est révélée par un indicateur de pH. La bactérie présente dans ce test est une bactérie lactique utilisée dans la fabrication de fromage et de yoghourt. Il s'agit d'une souche de *Streptococcus thermophilus* particulièrement sensible aux antibiotiques injectés lors du traitement de mammites. Ce test est plus long dans son opération, ce qui en limite davantage l'intérêt (BOULTIF, 2009). La figure ci-dessous illustre l'interprétation des résultats à la fin de l'incubation avec un Test Valio 101.



Positif : Lait non conforme **Négatif :** Lait conforme

Figure 02: Test et interprétation des résultats (Valio T101). (ROMNEE, 2009)

5.1.2. Méthodes physicochimiques

La détection rapide des résidus est basée sur une réaction spécifique entre l'analyte à déceler et un récepteur. Ce dernier peut prendre la forme d'un anticorps, d'un «récepteur » ou la présence du complexe « analyte – récepteur » peut être révélée par une réaction de type enzymatique.

La manipulation de ces tests est plus lourde que pour les tests microbiologiques. Ils nécessitent donc un personnel plus qualifié. Leur coût est un frein à une utilisation à grande échelle. En effet, il faut autant de tests que de molécules à rechercher, ce qui engendrent des coûts de plus en plus élevés lors du contrôle. (ROMNEE, 2009)

Ce sont des tests essentiellement de nature enzymatique, immunoenzymatique, immunologique et parfois chromatographique (HPLC).

Les méthodes enzymatiques pour principe l'inhibition d'une enzyme en présence d'un résidu d'antibiotique spécifique. Cette enzyme n'est alors plus révélée par un indicateur coloré (BROUILLET, 2002).

Les méthodes immuno-enzymatiques sont basées sur l'interaction antigène-anticorps, qui est très spécifique pour un résidu particulier. La technique la plus répandue est l'Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay (E.L.I.S.A.) (HUET *et a*l, 2006).

- **ELISA**

C'est la technique la plus répandue et le système de détection peut être basé sur des réactifs à enzymes marqués. Elle est rapide (de quelques minutes à 20 minutes) mais onéreux. Elle est spécifique pour une famille d'antibiotiques (souvent les ß lactamines) et sensible pour cette dernière, sa limite de détection est souvent inférieure à la limite maximale des résidus (ABIDI, 2004) Elle est très utile pour les contrôles de qualité, directement utilisables sur les sites de production (SCIPPO *et al*, 2006).

Aujourd'hui, il existe de nombreux kits ELISA de différent type utilisables pour un grand nombre de substances et notamment de nombreux antibiotiques. Ils sont disponibles pour un résidu spécifique ou pour un groupe de composés apparentés comme par exemple le groupe des fluoroquinolones. Les kits ELISA ont montré une bonne performance pour l'analyse des résidus d'antibiotiques dans la viande comme la tylosine, les tétracyclines, le chloramphénicol, les nitromidazoles et les sulphonamides (HUET *et al*, 2006).

- **Delvo xpress**

C'est un test immuno-enzymatique rapide, qui détecte les résidus de bêtalactamines présents dans l'échantillon en 10 min. consiste à faire réagir une quantité déterminée de lait avec une quantité précise d'une solution appelée "Tracer" (qui a pour fonction de complexer les bêtalactamines). Après un certain temps de contact suffisant, le mélange est versé dans un tube contenant un enduit qui réagit avec l'excédent de traceur libre. Le complexe bêtalactamine-Traceur est éliminé par rinçages successifs.

Un développeur colorimétrique réagit ensuite avec le traceur fixé sur la paroi du tube et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration des bêtalactamines dans l'échantillon testé (BOULTIF, 2009).

❖ **Penzym Test**

Le Penzym est un test qualitatif, facile d'emploi, très rapide et spécifique des antibiotiques de la famille des bétalactames et se base sur une réaction enzymatique et colorimétrique (BROUILLET, 1994).

L'enzyme DD-carboxypeptidase est mélangé au lait par simple pipetage et mis à incuber à 47°C, pendant 15min ; un complexe stable est formé entre l'enzyme et l'antibiotique. Apres 5min d'incubation un comprimé qui contient tous les réactifs nécessaires est ajouté, la coloration du tube est comparée à une carte de couleur (ABIDI, 2004).

L'application de ce test à la détermination des antibiotiques dans la viande est entravée par la présence des pigments rouges liés à des protéines hémoglobine, myoglobine (DANHAIVE, 1986) (voir la figure 03).

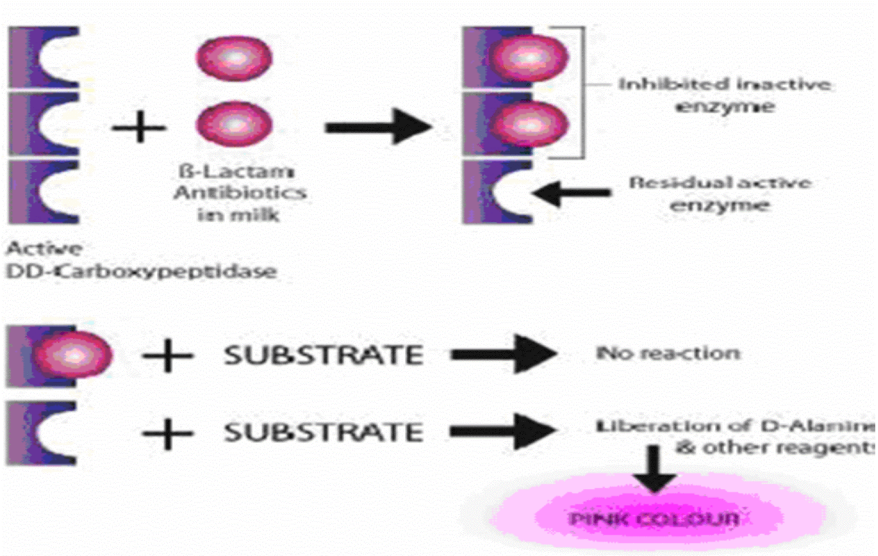


Figure 03 : Schéma de principe du PENZYM TEST (ROMNEE, 2007).

❖ **Beta star Test**

C'est un test rapide, simple d'emploi, du type Récepteur Assay (dosage de récepteur). Le test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Il permet la détection rapide, dans le lait, des résidus de pénicillines et de céphalosporines (Scippo et Maghuin-Rogister, 2006) Cette méthode est mise en cause pour le cout très cher des particules d'or utilisé. La figure suivante illustre le principe de base du test β-star.

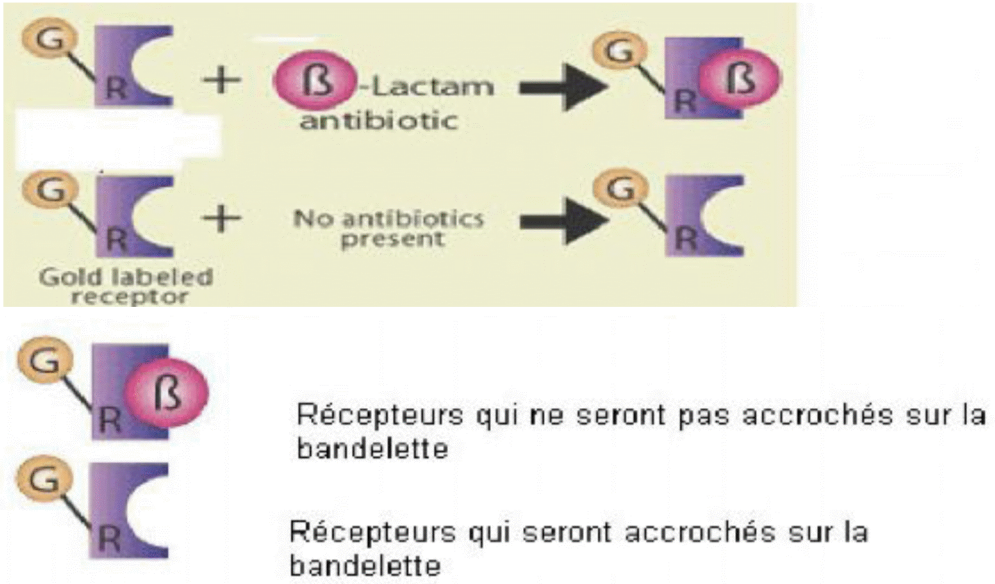


Figure 04: Principe de réaction du ß-STAR (GAUDIN, 2005)

Et cette figure illustre le mode de lecture du test ß-STAR

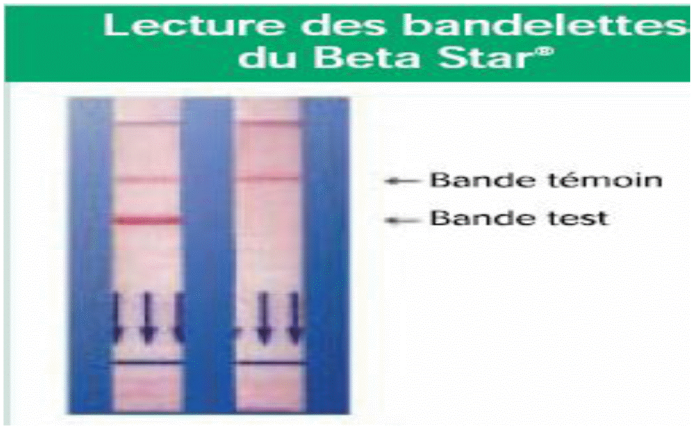


Figure 05: Interprétation des résultats du ß-STAR (REYBROECK, 2004)

❖ **CHARM Test**

Il permet la détection de nombreux antibiotiques (pénicilline, tétracycline, macrolides, sulfamides, aminoglycodides…) par une réaction d'immunocompétition entre la molécule à rechercher et une molécule marquée au C14 ou H3. (voir figure 06)

C'est un test de compétition mesuré par radioactivité (propriétés de scintillement du lait contaminé) qui permet une identification précise et un dosage, qui peut être calé sur les seuils des limites maximales des résidus. Il nécessite un investissement important mais permet d'identifier l'inhibiteur présent (BROUILLET, 2002).

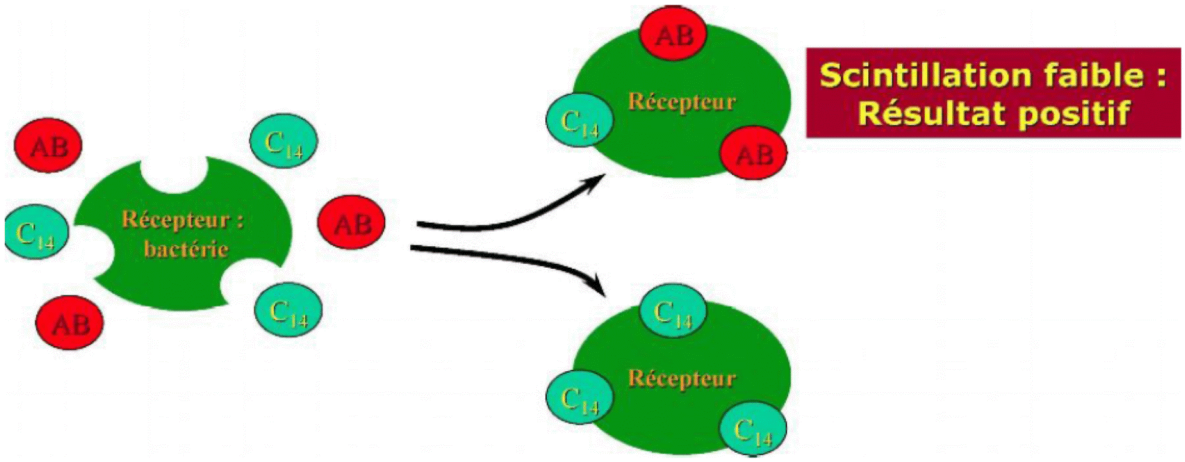


Figure 06: Principe de Charm test (VERHNES, 2002)

❖ **La chromatographie (HPLC) :**

La chromatographie liquide haute performance vient compléter la liste des tests physicochimiques. Elle est utilisée dans la détection de multiples résidus d'antibiotiques tel que les résidus de quinolone, de sulphonamides, de β-lactamine, de macrolide, de tétracycline, et ce, dans des types d'échantillons très variés tels que le lait ou les tissus (KENNEDY *et al*, 1998).

5.2. Méthodes de confirmation :

Les méthodes de dépistage doivent être complétées par des méthodes de confirmation qui sont appliquées sur les échantillons détectés positifs par les méthodes de dépistage. Les méthodes de confirmation doivent identifier sans ambiguïté la molécule de résidu et doivent pouvoir la quantifier à un niveau au moins deux fois inférieur à la LMR (STOLTZ, 2008).
Ces méthodes ont l'inconvénient de nécessiter une très haute technicité du personnel et de coûter très cher (DELPHINE, 2002).

Dans la plupart des cas, deux méthodes sont mise en avance pour la confirmation des faux positifs ; la HPLC ainsi que la Spectrophotométrie de masse, ce choix est sans doute du à leurs sensibilité remarquable et leurs efficacité dans le contrôle.

- **Chromatographie Liquide à Haute Performance**

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une d'entre elles est constitué par un lit de matériaux stationnaire ou fixe, au travers du quel s'infiltre la deuxième phase mobile (CHEBIRA, 2009). Dans l'HPLC, la phase mobile parcourt un tube appelé colonne, celle-ci peut contenir des granules poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, le gel est appelé phase stationnaire. Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne et est entrainé à travers celle-ci, ce mélange doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant et éviter toutes perte de charge. Si la phase stationnaire a été bien choisi, les constituants du mélange sont appelés généralement solutés et sont inégalement retenue lors de la traversée (MOATS, 1984).

De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesse de déplacement sont différentes, ils sont ainsi éluées de la colonne les uns après les autres, et donc séparées.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme (BOULTIF, 2009).

Selon CHEBIRA, 2009, dans l'HPLC on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile ;
- une ou plusieurs pompes ;
- un système d'injecteur ;
- des colonnes ;
- un ou plusieurs détecteurs ;
- et un ordinateur (enregistreur).

Cet appareillage est illustré clairement dans la figure ci-dessous :

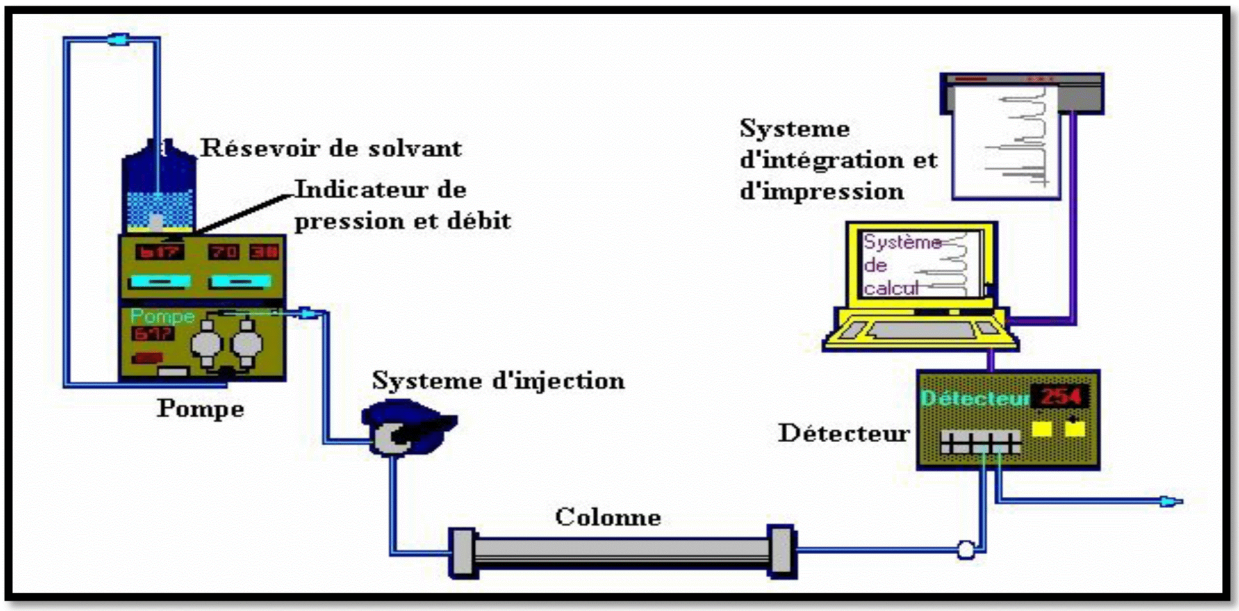


Figure 07 : instrumentation de l'HPLC (BOULTIF, 2009).

- **Spectrophotométrie de masse**

C'est une méthode physico-chimique permettant d'identifier un principe toxique. Elle permet la mesure des rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations.

Le spectrographe de masse consiste à ioniser par des électrons une molécule A. Celle ci va donc donner une entité A+ ayant perdu un électron. A+ va pouvoir se scinder en plusieurs groupements (chargé + ou non) plus petits, ou bien se réarranger. On accélère alors ces particules par un champ électrique, puis elles sont déviées par un champ magnétique.

Le nombre de molécules sera perçut sur la plaque sensible du détecteur, en effet, plus nombreux sont les ions d'un type donné, plus intense sera la tache obtenue (ZEGHILET, 2009). Le principe de la SM est résumé dans la figure suivante :

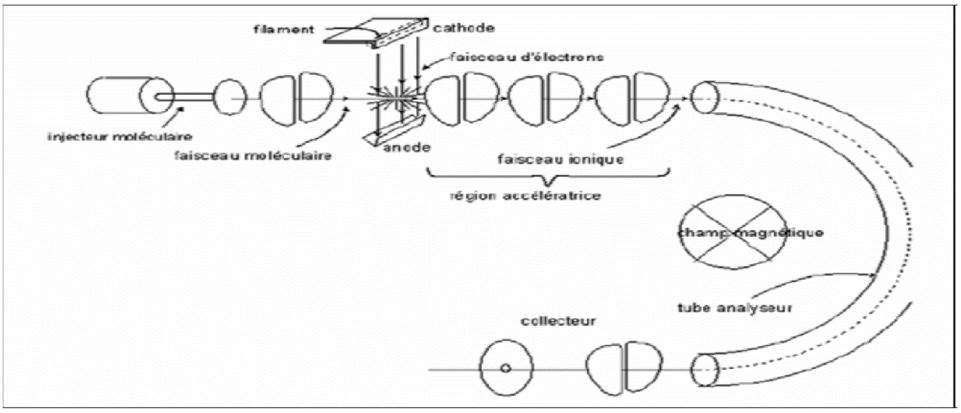


Figure 08 : Schéma de principe de base d'une SM (BOULTIF, 2009)

Un nombre important de laboratoires utilisent l'association des deux méthodes citées, elles sont aujourd'hui au sommet de la détection et trouvent des applications dans des domaines variés tel que l'industrie agroalimentaire, la médecine, la pharmacologie ou l'environnement. Dans la détection des résidus d'antibiotiques, on poursuit ces deux démarches :

- La chromatographie liquide haute performance avec ionisation électro-spray à pression atmosphérique (HPLC-ESI) associée à la spectrométrie de masse (SM). C'est la technique de choix pour identifier et doser le chloramphénicol par exemple.
- L'HPLC-SM avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI en anglais). (STOLTZ, 2008)

.

Conclusion

Nous avons procédés dans cette partie à une petite investigation bibliographique sur les antibiotiques et leurs résidus afin de définir l'impact des traitements des antibiotiques sur l'élevage intensif moderne des animaux aussi sur la santé humain.

En premier lieu, l'utilisation non contrôlé ou irrationnel des antibiotiques peuvent entrainer des risques hygiéniques et sanitaires par leur présence sous forme de résidus dans les denrées alimentaire, et des risques de sélections bactériennes résistantes qui peuvent engendrer des infections plus graves chez les consommateurs.

Le danger de présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaire pose un véritable problème de santé humain, qui nous amènent a la nécessité d'instaurer des plans de surveillance et de contrôle des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA). Des méthodes de leur détection, en usage chez les professionnels (service d'inspections, industriels, chercheurs) existent à cet effet et sont sans cesse améliorées pour les rendre plus fiables.

La finalité des études scientifiques reste donc la constitution de bases de données exploitables par les pouvoirs publics, pour l'élaboration de règlementations et des prises de décisions visant à protéger la santé des consommateurs. En effet, l'Algérie à l'instar de nombreux pays du continent d'Afrique accuse un retard par rapport au reste du monde en matière de règlementation des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires, et ne possède pas de véritables plans de surveillance de la commercialisation, de l'utilisation et de la présence des résidus d'antibiotiques dans les DAOA. Ce qui nous amène à formuler un certain nombre de recommandations :

-Aux pouvoirs publics pour l'adoption rapide des textes règlementant pour la présence des résidus d'antibiotique dans les denrées alimentaires et le renforcement des capacités des laboratoires de contrôle.

-Aux éleveurs pour l'abandon des mauvaises pratiques, le souci de la santé animale doit etre laissé uniquement aux professionnels.

-Aux vétérinaires et pharmaciens vétérinaires pour une plus grande rigueur dans la délivrance des ordonnances et la vente des antibiotiques.

-Aux associations de consommateurs pour plus de sensibilisation sur le sujet et une réelle implication dans les organismes de normalisation nationaux.

Introduction

Dans le domaine alimentaire, la qualité est une préoccupation ancienne et récurrente qui reste toujours au cœur des inquiétudes des consommateurs ; les entrepreneurs ainsi que les services de contrôles citons les systèmes nationaux et les laboratoires d'analyses sont appelés à regrouper leurs efforts afin de présenter au citoyen un aliment sain et salubre de bonne qualité organoleptique.

Selon la FAO, le contrôle alimentaire est une activité officielle et obligatoire de la réglementation, elle incombe aux autorités nationales et locales chargés d'assurer la protection du consommateur, de veiller à la sécurité sanitaire et à l'intégrité et à l'adaptation à la consommation humaine de tous les aliments, au cours des stades de production, manutention, entreposage, transformation et distribution. Les autorités doivent également veiller à la conformité des denrées alimentaire ainsi qu'à l'honnêteté et à l'exactitude de l'étiquetage.

De ce fait, on déduit l'importance de la notion de contrôle et de qualité dans la vie quotidienne du consommateur et dans l'intégrité des échanges commerciaux des pays.

Au sein du laboratoire pédagogique, nous nous sommes tournés vers des analyses physicochimiques optant pour la recherche de différentes composantes de quelques denrées alimentaires afin d'évaluer leur qualité physicochimique, nous avons effectués quelques dosages tel : Le dosage de la vitamine C dans quelques jus de fruit par un agent réducteur 2.6 dichlorophenol, dosage des glucides en utilisant 3.5 dinitrosalycilique (DNS), dosage des protéines du lait de vache et de chamelle par la méthode de Lowry (1951), une hydrolyse enzymatique des caséines du lait de vache et de l'ovalbumine de l'œuf par la papaïne et enfin des méthodes de purification et de séparation qui sont la chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200 et l'électrophorèse sur PAGE SDS et Native.

6. Matériels et Méthodes

Notre stage pratique porte sur la réalisation de plusieurs travaux pratiques qui se traduisent en des contrôles physicochimiques sur quelques denrées alimentaire au niveau du laboratoire pédagogique du département de biologie de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

6.1. Matériels

6.1.1. Matière biologique

Les échantillons analysés sont de composition, d'origine et de nature différentes, on les répartie en :

Les échantillons de jus : Jus Rouiba Light, Jus Ramy en bouteille, Jus lacté (Soummam) , iFruit (Ifri).

Les échantillons de lait : Lait de vache, Protéines sériques lyophilisées du lait de vache, Protéines sériques lyophilisées du lait de chamelle, Caséines du lait de vache.

Les échantillons de matière grasse : Huile d'olive, Smen, Beurre « Président », Huile de Soja.

Autres échantillons : Ovalbumine de l'œuf Solution de glucose, BSA (Solution mère d'albumine Sérique Bovine).

6.1.2. Matériels utilisés

6.1.2.1.Verrerie : Burette (100ml) , bécher (50,100,250,500 et 1000ml) , fioles jaugées(10, 25,50, 100, 250, 500), erlen meyer, pipette graduées(1, 5et10ml) , tubes à essai, eprouvette(50 et 250 ml), entonnoir, coupelle, seringue d'Hamilton, colonne de chromatographie(20 X 1cm), plaque d'électrophorèse(10X 8X 0.75cm), tubes à essai.

6.1.2.2. Appareillage

- unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales comprenant : cuves d'électrophorèse, générateur de courant, plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 X 8 cm), des espaceurs, peigne ;

- unité de chromatoraphie de perméation sur gel SEPHACRYL S200 : une colonne chromatographique contenant le gel (dimension 1.6 X 15cm), un détecteur UV, une pompe péristaltique, un collecteur et un enregistreur graphique ;

- balance de précision à 0.01 mg (SARTORUS) et balances analytiques à affichage digital (0.01g) (Denver Instrument) ;

- spectrophotomètre UV Visible (SCHIMADZU, Japon) ;

-pH mètre (Hanna-instruments) ;

- lyophilisateur à plateau (BETA, Allemagne) ;

- centrifugeuse réfrigérée, max 28 000 x g (SIGMA) ;

- agitateurs variés (de tubes, à plateau, à barreaux magnétiques chauffant et non chauffant…)

- dessiccateur ;

- bain marie (Memmert, Allemagne) ;

- pompe pour le dégazage.

6.1.2.3. Autres : Poire, micropipette (20-200µl) (100-1000µl), eppendorf, statif, spatule, barreaux magnétique, tige, coupelle en plastique, papier filtre, portoir, dispositif pour électrophorèse, plaque, peigne, pissette.

6.1.3. Produit chimique et réactifs

- Dosage de la vitamine C : DCPIP (2.6 dichlorophenol indophénol), Eau distillé, Bicarbonate de Sodium ($NaCO_3$), Acide ascorbique, Acide acétique glacial($C_2H_4O_2$).
- Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse : Ethanol(C_2H_6O), Potasse KOH, Thiosulfate de Sodium ($Na_2S_2O_3$, 0.02N), Empois d'amidon, Phénophtaléine, Lugol.
- Dosage des glucides : Acide 3.5 dinitrosalycilique (DNS).
- Dosage des protéines : Anhydre (Na_2CO_3) à 2%, NaOH (Hydroxyde de Sodium), Sulfate de Cuivre pentahydrate($CuSO_4$ $5H_2O$ 0.5%),Tartrate de Na et K, Réactif de Folin Ciocalteu.
- Hydrolyse enzymatique et électrophorèse : Tampon Tris-HCl, Papaïne , Gel Sephacryl S200, Bleu de Dextrane, Acrylamide, Glycine, SDS (Dodecyle sulfate de sodium), Glycérol, Bleu de Bromophenol, TEMED(N-N-N-N tetramethyle éthylène diamine , Solution de persulfate d'ammonium, HCl(Chlorure d'hydrogène), B-Mercaptoéthanol, TCA(acide trichloracétique), Bleu de Coomassie, Méthanol(CH_4) .

6.2. Méthodes expérimentales

Nos travaux pratiques reposent sur des analyses physicochimiques qui se répartissent en dosages volumétriques et méthodes electrophorétiques.

6.2.1. Méthodes physicochimiques

6.2.1.1. Dosage de la vitamine C et évaluation de sa teneur dans différentes conditions

Principe

Oxydation de la vitamine C par un agent réducteur qui est 2.6 dichlorophenol indophénol dans un milieu acide l'équation suivante :

Acide ascorbique ⟶ $2\,H^+ + 2^+$ + acide dehydroascorbique

Dichlorophenol indophénol + $2\,H^+ + 2\,e^-$ ⟶ Leucodérivé réduit

Le DCPIP est incolore sous forme réduite et coloré sous forme oxydé (bleu basique et rose en milieu acide).

Expression des résultats

La détermination de la teneur en (g/l) de la vitamine C est donnée par la formule suivante :

$$C = \frac{C1 \times V1}{V}$$

C : Teneur en vitamine C en g /l

C1 : Concentration de la solution d'acide ascorbique (g/l)

V1 : Volume de DCPIP versé en ml

V : Volume de l'échantillon utilisé en ml

6.2.1.2. Détermination des indices d'iode et d'acide d'une matière grasse

6.2.1.2.1. Indice d'iode

Principe

L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iode fixés par 100g de corps gras, le principe consiste en une fixation des halogènes sur les doubles liaisons éthyléniques des acides gras insaturés. Elle est exprimée selon l'équation suivante :

$$\boldsymbol{I(i) = \frac{(V1-V0)\times 0.01269\times 100}{P}}$$

(V_1-V_0) : Différence des résultats de titrage de l'essai à blanc et de l'essai avec corps gras

P : Poids de la prise d'essai exprimé en gramme

0.01269 : Nombre de gramme d'iode correspondant à 1 ml de thiosulfate

100 : Traduction en 100 g de corps gras

6.2.1.2.2. Indice d'acide

Principe

L'indice d'acide est la quantité d'acide gras libre dans une huile. Il est défini comme la masse d'hydroxyde de potassium, exprimé en mg nécessaire à la neutralisation de tous les acides gras libres contenus dans 1 g de corps gras. Elle est exprimée selon le schéma réactionnel suivant :

$$\text{R-COOH} + \text{K}^+\text{OH}^- \longrightarrow \text{R-COO-K} + \text{H}_2\text{O}$$

Acide gras base savon eau

Expression des résultats

$$\textbf{Acidité (\%)} = \frac{N \times V \times M}{m} \times 100$$

M : Le poids moléculaire de l'acide oléique

V : Volume de KOH à 0.1 N utilisé pour la titration

m : La masse en gramme de la prise d'essai

N : Normalité de KOH

6.2.1.3. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu (acide phosphotungsto-molybdique) est plus au moins réduit par les protéines (les groupements oxydés des acides aminés), notamment les groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine et dans une moindre mesure, ceux de la cystéine et histidine (la liaison peptidique est aussi impliquée).

Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : bleu de molybdène dont l'intensité peut-être mesuré au spectrophotomètre à 750nm.

La sensibilité du dosage est augmentée par un prétraitement préalable de la réaction par un réactif de cuivre au milieu basique.

Expression des résultats

Construire une courbe étalon : DO = F [BSA] et déterminer à partir de celle-ci la concentration en protéine dans l'échantillon.

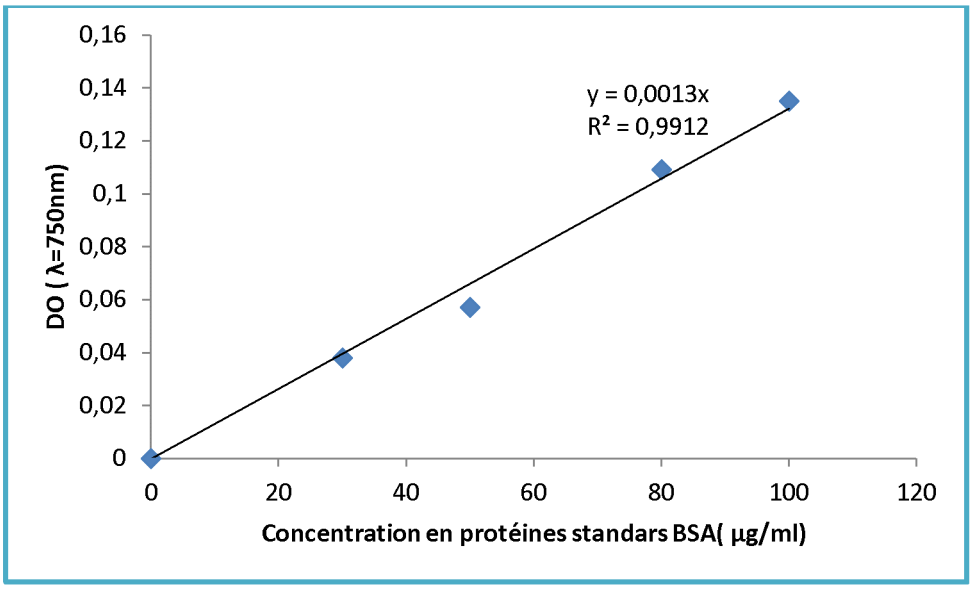


Figure 09 : Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de Lowry et *al* (1951) réalisée avec le Sérum Albumine Bovine (BSA) comme protéine de référence.

6.2.1.4. Dosage des glucides en utilisant 3.5 dinitrosalycilique (DNS)

Principe

A chaud et en milieu alcalin, il ya réduction de l'acide 3.5 dinitrosalycilique en 3-amino-nitrosalicilique en présence de sucres réducteurs selon la réaction :

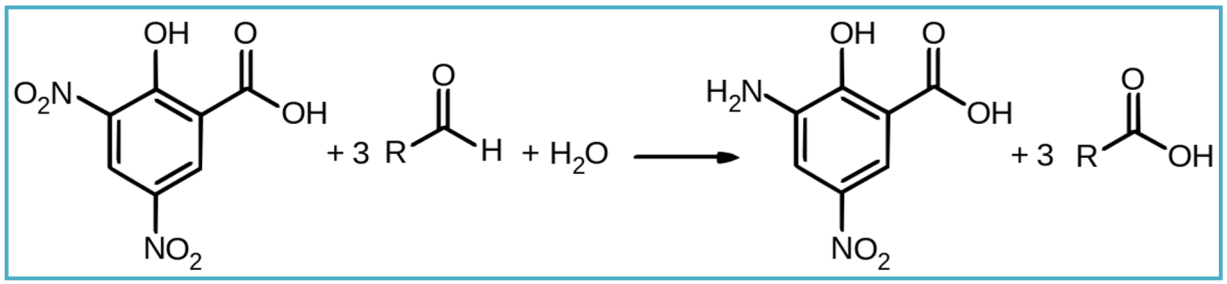


Figure 10 : Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (AUDIGIE et *al*, 1978)

Le composé obtenu est rouge orangé à reflet pourpres. Il peut être dosé par spectrophotomètre (λ = 530nm).

Expression des résultats

La concentration de l'échantillon en glucide est obtenue après traçage de la courbe étalon : DO = F [Solution de glucose].

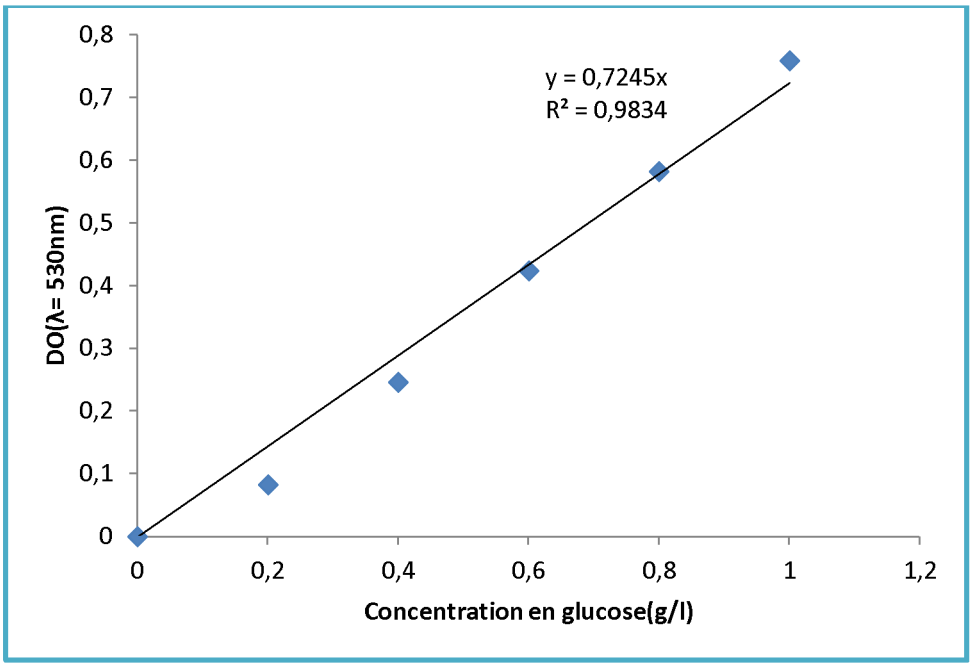


Figure 11 : Courbe étalon des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.

6.2.2. Méthodes de séparation et de purification

6.2.2.1. Hydrolyse enzymatique des protéines par la papaïne

Principe

Dégradation des protéines par la rupture des liaisons peptidiques sous l'action de la papaïne mis à un pH et une température optimum.

Expression des résultats

Les composantes de la protéine sont observées et comparé à un témoin sur un profil electrophorètique.

6.2.2.2. Chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200

Principe

La chromatographie d'exclusion moléculaire ou de perméation sur gel est une technique chromatographique liquide basée sur le tamisage moléculaire, elle permet de séparer les

molécules en fonction de leur poids moléculaire. La phase stationnaire étant un gel poreux. Les molécules de grandes tailles traversent les interstices (Volume mort V_0) et sont exclues les premières, quant aux molécules de l'échantillon traité, elles sont élués plus tardivement car incluses dans le gel, leurs migrations est freinées.

La phase stationnaire est constitué de SEPHACRYL S200 qui est un gel préparé par réticulation covalente d'un allyle de Dextrane avec du N.N' méthylène Bisacrylamide. Ce gel ayant une grande stabilité possède un domaine de fractionnement situé entre 5.10^3 et $2,5.10^5$ Da.

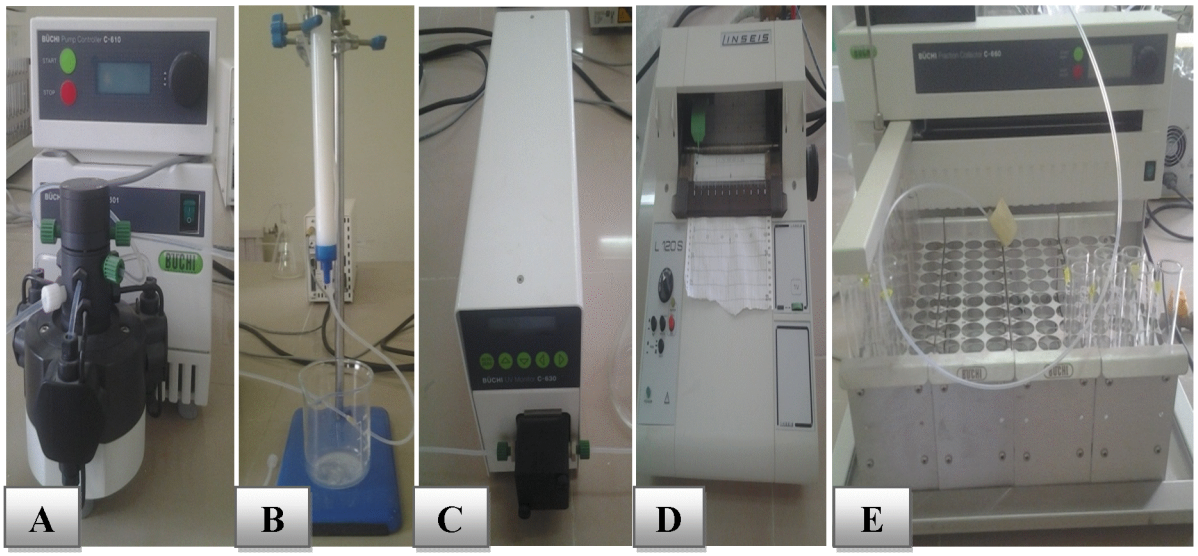


Figure 12: Photographie d'une unité de chromatographie basse pression (Laboratoire pédagogique UMMTO)

A : Pompes péristaltiques, **B :** Colonnes (30 X 1.5 cm), **C :** Détecteur UV, **D :** enregistreur, **E :** Collecteur de fractions.

Le système chromatographique est composé d'un appareil de pompage qui alimente la colonne en tampon de calibrage, celui-ci est suivi d'un spectrophotomètre puis d'un injecteur pour la récupération des échantillons dans de petits tubes à essai, enfin la courbe de distribution des masses moléculaire obtenue grâce à un système d'acquisition ou enregistreur.

Expression des résultats

La présence d'une molécule dans l'échantillon est enregistrée par le spectrophotomètre puis traduit en un pic.

Cette lecture doit s'accompagner d'une électrophorèse qui confirme les résultats précédents sous forme d'une bande pour chaque molécule.

6.2.2.3. Electrophorèse sur gel polyacrylamide

L'électrophorèse est une technique consistant à faire migrer des molécules dans un gel sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation.

La manipulation nécessite une cuve electrophorètique, un générateur électrique, un gel de polyacrylamide contenant des puits pour les dépôts de l'échantillon ainsi que des solutions tampon adaptées au gel.

Lors de notre expérimentation, on effectué deux électrophorèses, une PAGE Native et une PAGE SDS.

6.2.2.3.1. Electrophorèse sur PAGE SDS

Dans cette technique, la séparation se fait sous la présence du SDS ou Dodecyle Sulfate de Sodium qui est un détergent anionique et un puissant agent dénaturant. En présence d'un agent réducteur chargés de rompre les ponts disulfure 2. Mercaptoéthanol et à température élevée, le SDS permet de solubiliser les protéines et de se fixer à ces derniers en leurs conférant une charge négative. De ce fait, les différents composés ne seront différenciés par migration electrophorètique que selon leurs poids moléculaire.

Cette méthode utilise deux types de gels superposés, un gel de concentration de T= 4.8% et C = 2.7 % qui n'exerce aucun effet de tamisage sur les protéines et tend plutôt à les concentrer et un gel de séparation de T = 17% et C = 2.7% qui permet de séparer les protéines selon leurs poids moléculaire.

La structure du gel est définie par les indices T et C. Sa porosité est ajustée en faisant varier les concentrations relatives de a et b ; la taille effective des pores d'un gel est d'autant plus petite que sa concentration en acrylamide est élevée :

$T = (a+b /v) \times 100$

$C= (b/a+b) \times 100$

a : acrylamide (g)

b : N.N'-methylène- bisacrylamide (g)

V : Volume du tampon

Les résultats sont révélés par des bandes de migration electrophorètique après démoulage, fixation, coloration et décoloration des échantillons.

Figure 13: Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260)

6.2.2.3.2. Electrophorèse PAGE Native

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE Native) est une méthode particulièrement résolutive pour les protéines globulaires. Celles-ci migrent dans ce cas, selon leur charge nette et leurs poids moléculaire.

La PAGE native est réalisée selon la méthode de HILLIER (1976), adaptée à un système de mini cuves HOEFFER au niveau LABAB, avec un gel de polyacrylamide de porosité (T = 12%, C = 2.7%).

Le tampon de gel est constitué de Tris 0.75M, Ph 8.9. Le tampon de gel est constitué de Tris 0.75 M, pH 8.9. Le tampon de gel est constitué de Tris 5mM, glycine, 77Mm, Ph 8,3. Les échantillons sont dissous dans le tampon d'échantillons composé du tampon de gel (1/10 V/V), de l'eau distillé (7/10 V/V) et du glycérol 10% (V/V).(Annexe 06)

6.2.2.3.3. Révélation des bandes de migration

A la fin de l'électrophorèse et après démoulage du gel, les protéines sont premièrement fixées dans une solution de TCA 12% (p/v) pendant 45minutes, puis colorées pendant 2 heures par le bleu de Coomassie à raison de 0.2 %(p/v) dissous préalablement dans une solution contenant de l'eau distillé (1 Volume) et du TCA 2% (p/v).

En fin, la décoloration du gel s'effectue dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions (3,12/1,50/0,37 ; v/v/v).

7. Résultats et discussion

7.1. Dosage de la vitamine C dans un jus d'orange et influence de quelques paramètres sur sa teneur

7.1.1. Teneur en vitamine C dans quelques jus commercialisés

Les teneurs en vitamines C des différents jus analysés, ainsi que leur pH sont présentés dans le tableau suivant.

TABLEAU VI: Les teneurs en vitamine C dans quelques jus commercialisée et leurs pH.

Echantillon / Paramètre	Jus lacté	iFruit	Ramy en Bouteille	Rouiba	Rouiba Light
Concentration en vitamine C (mg/l)	105	352	253	460	228
pH	4.36	3.27	3.33	3.22	3.29

Les teneurs en vitamine C dans les différents jus analysés sont situés entre une valeur minimale de 105mg/l pour le jus lacté, et une valeur maximale de 460 mg/l pour le jus Rouiba.

D'après ce tableau, on constate que la teneur en vitamine C pour le jus Ramy en bouteille de 253mg/l et Rouiba light de 228mg/l sont conforme aux normes lancées par l'AFNOR qui est de plus au moins 200 mg/l. cependant, le jus iFruit et Rouiba présente des valeurs de 352 mg/l et 460 mg/l respectivement qui sont un peu supérieur à la norme, ceci pourrait être expliqué par un rajout excessif d'acide ascorbique autant qu'additif alimentaire, ou leur enrichissement lors de fabrication.

Contrairement au jus lacté qui présente une faible teneur en vitamine C de 105 mg/l qui est inférieure à la norme de l'AFNOR, qui peut s'expliquer de l'oxydation de celle-ci dans des conditions d'aération permanente et d'une température inconvenable, aussi la présence d'ions métalliques favorisera aussi le phénomène. Lors de la dilution du concentré, de l'ajout des fractions aromatiques, l'agitation et la vitesse de pompage doivent être soigneusement contrôlée, afin de limiter l'incorporation d'oxygène. (SIZER *et al*, 1988).

La dégradation pourrait aussi se faire dans un milieu anaérobie lors du stockage à long terme aboutissant à l'apparition de réductones ; intermédiaire de la réaction de Maillard et en milieu acide et à chaud, l'acide ascorbique subit une déshydratation et une décarboxylation qui conduisent à la formation de gaz carbonique et de furfural (HUELI *et al*, 1971), ce dernier qui est un composé volatile, caractérisé par leur toxicité, provoquant des symptôme similaires à ceux rencontrés dans l'intoxication par différents solvants, notamment une certaine

euphorie, des maux de tête, des étourdissements, des nausées et dans les cas extrêmes, la perte de conscience et la mort par insuffisance respiratoire.

Les valeurs de pH des jus analysés sont entre 4,36 pour le jus lacté et de 3,22 pour le jus Rouiba qui est plus acide, cela est due à sa teneur en acide citrique qui est une molécule hautement polaire qui contient trois groupements carboxyliques et un groupement hydroxylé (BOUROKAA, 2012).

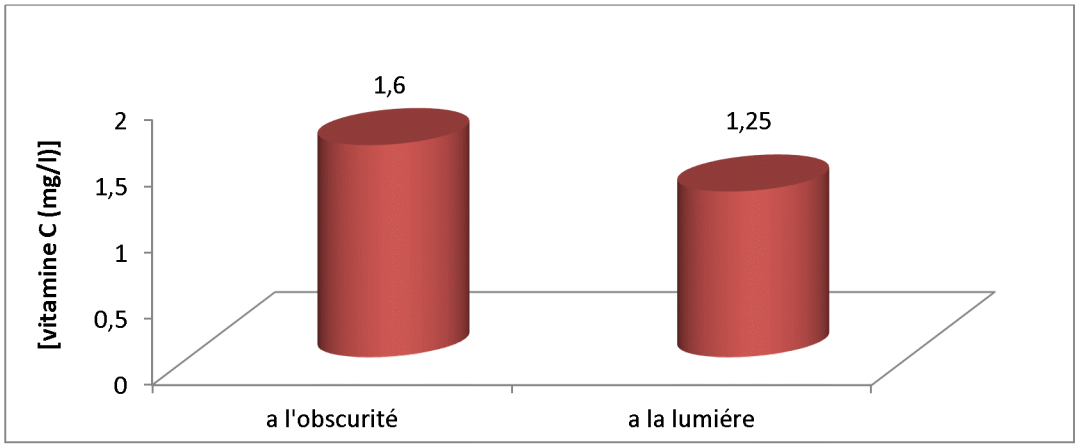
Les valeurs présentés dans le tableau sont presque conforme a la norme spécifique de différentes unités qui exige des pH sis entre 3 à 4 pour tous les jus (SADOUKI *et al*, 2014) à l'exception de jus lacté qui présente un pH de 4,36 qui est plus au moins supérieur a la norme de l'unité, qui peut s'expliquer par une erreurs de manipulation ou a la poudre de lait ajouté .

L'acide ascorbique intervient dans de nombreuse réactions biochimiques dont les mieux décrites sont les réactions d'hydroxylations citons la biosynthèse du collagène et de la Carnithine ainsi que la transformation du cholestérol en acides biliaires en plus de son rôle de favorisation d'absorption du fer (HALLIWELL, 1994).

7.1.2. Evolution de la teneur en vitamine C sous l'influence de la chaleur et de la lumière

7.1.2.1. Effet de la lumière sur la vitamine C

L'évolution de la concentration en vitamine C de deux échantillons du jus, l'un mis a l'obscurité et l'autre exposé à la lumière, sont représentés dans l'histogramme suivant :



. **Figure 14:** Evolution de la teneur en vitamine C selon l'intensité de la lumière

D'après la figure ci- dessus, on constate que la lumière a un effet sur les pertes en vitamine C, qui présente une valeur de 1,25mg/l qui est inférieur comparativement a celle de l'échantillon mis a l'obscurité 1,6 mg/l.

La bibliographie a montré que l'effet de la lumière sur la teneur en vitamine C des jus demeure controversé, (SATARR *et al,* 1989), montrent que la lumière artificielle fluorescente

d'intensité de 540-650 lux, avait un effet sur les pertes en vitamine C dans des jus d'orange stockées dans des bouteilles de verre à température ambiante. Toute fois ces auteurs ont mis en évidence l'effet négatif du rayonnement UV sur les teneurs en vitamine C et sur la couleur du jus. La vitamine C pourrait réagir avec les radicaux libres formés par les UV ce qui entraineraient des pertes et de l'apparition du brunissement non enzymatique. Et pour limiter considérablement les pertes en vitamine C, et l'apparition du brunissement non-enzymatique qui sont des facteurs influent sur la qualité de stockage des jus. Alors, il suffit donc de soumettre Les jus d'orange flash-pasteurisés à l'obscurité puis conservés au réfrigérateur domestique pendant des temps trop courts (RODRIGUEZ *et al,* 1991).

L'ajout des sulfites et les thiols limitent les brunissements, alors les sulfites réagissent avec les composés carbonylés intermédiaires et forment des sulfonâtes qui sont moins aptes à participer au brunissement. Cependant, l'ajout de ces composés n'est pas autorisé dans le jus d'orange (BERLINET C, 2006).

7.1.2.2. Effet de la chaleur sur la vitamine C

L'évolution de concentration de la vitamine C, au bout de l'exposition aux différentes températures sont illustrés dans le tableau suivant :

TABLEAU VII : Evolution de la teneur en vitamine C selon la température.

Température °C	20	40	80
Concentration (g/l)	1.25	1.17	1.17

Les teneurs en vitamine C de la solution d'acide ascorbique après leur exposition à la chaleur, induit une légère baisse de concentration aux températures de 40 C° et 80 C° de 1,17 mg/l par apport a une concentration de 1.25 mg/l a température de 20 C°.

En effet, selon MAREZ *et al*. (2004), la vitamine C est sensible à la chaleur et son taux dans le jus peut diminuer d'une façon très importante après pasteurisation, alors que GIL-IZQUIERDO *et al*. (2002) n'ont pas observé de pertes après un traitement à 95 C° pendant 30s. Cependant le taux d'oxygène dissous s'avère le facteur essentiel lié à l'oxydation de la vitamine C dans un jus.

La chaleur est un facteur essentiel d'oxydation de l'acide ascorbique, cette dernière conduit à la formation de l'acide dehydroascorbique qui s'hydrate rapidement en donnant des composés bicyclique qui sont trop toxique.

7.2. Détermination des indices d'acide et d'iode d'une matière grasse

7.2.1. Indice d'acide (IA)

Les valeurs des indices d'acide des différents corps gras analysés sont représentées dans l'histogramme de la figure suivante :

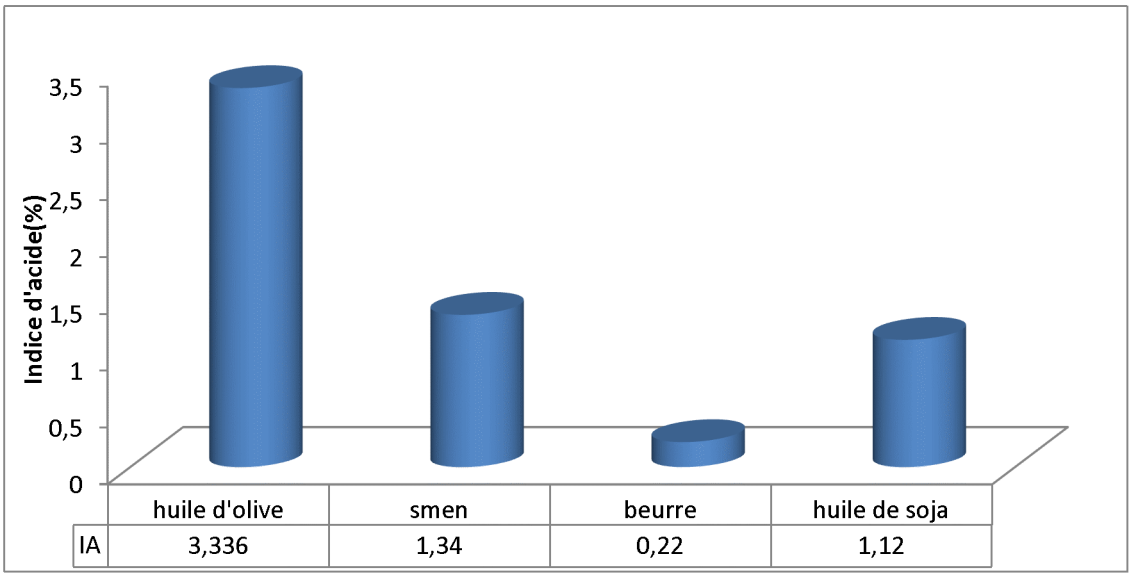


Figure 15: histogramme représentatif d'indices d'acide des différents corps gras analysés.

Dans la représentation graphique de paramètre d'acidité des différents corps gras analysés, on observent que l'huile d'olive présente un degré d'acidité plus élevé de 3,36% comparativement aux autres échantillons qui présentes des valeurs d'acidité sis entre 0.22% pour le beurre et 1,12 a 1,34 pour l'huile de soja et Smen. L'indice d'acide de l'huile d'olive entre dans les normes imposées par le CODEX ALIMENTARUIS, sachant que notre échantillon est classé dans la catégorie de l'huile d'olive vierge courante. Une huile dépassant la norme de 3.3 est considéré non comestible et doit être impérativement raffinés.

En effet, l'acidité de l'huile d'olive peut s'expliquer par le résultat d'hydrolyse partielle ou totale des triglycérides par des lipases, donnant des acides gras libre, elles entrainent la diminution du pH des corps gras. Généralement ces réactions d'hydrolyses s'accompagnent d'une oxydation, car les acides gras s'oxydes facilement lorsqu'ils sont à l'état libre, les substrats des réactions d'oxydation sont principalement les acides gras insaturés, qui s'oxydent plus vite lors qu'ils sont à l'état libre même lors de l'entreposage des aliment à l'état congelé, tandis que les acides gras saturés ne s'oxydent qu'à des températures supérieurs a 60 C° (ELATYQY, 2013).

Cependant, l'oxydation des lipides conduit également a la formation des peroxydes qui sont très cancérigènes à l'ajout de dégradation des propriétés organoleptique (rancissement) et nutritionnelles causé par la formation des composés volatils d'odeur désagréable (DJADOUN, 2009).

Les facteurs responsables d'acidité élevé sont lié au non respect des conditions de récolte, aux techniques d'extraction et au conditionnement de l'huile, Cependant elle pourrait être également attribué à l'état de maturation avancé du fruit et au stockage prolongé et inadéquat avant la trituration. Les olives dans ce cas peuvent subir des lésions qui vont engendrer des contaminations de l'huile.

7.2.2. Indice d'iode

Les valeurs d'indice d'iode des différents corps gras analysés, sont représentées dans l'histogramme de la figure suivante :

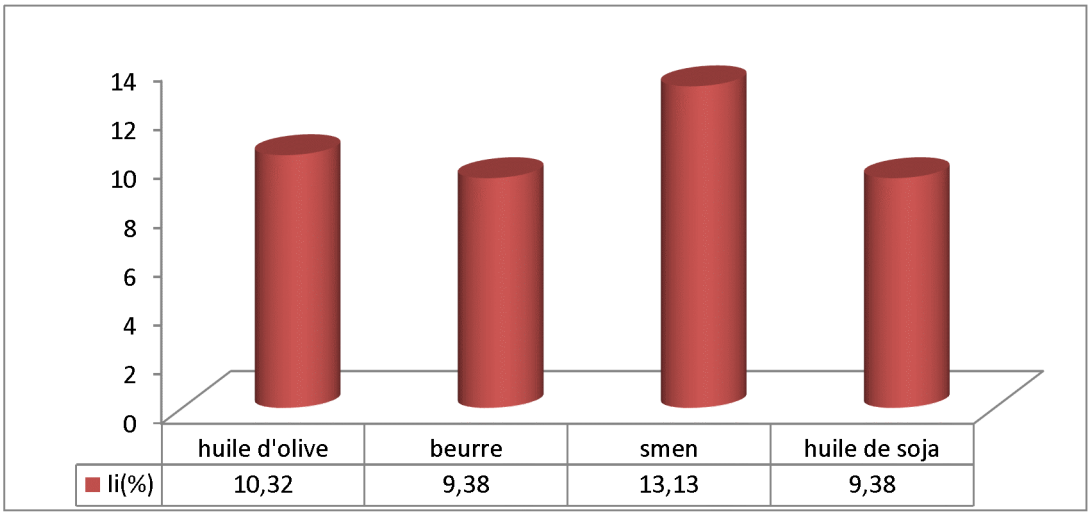


Figure 16 : Histogramme représentatif d'indice d'iode des différents corps gras analysés

D'après les résultats d'analyses effectué, l'histogramme ci-dessus nous indique que, chaque matière grasse a un indice d'iode spécifique, qui nous donne une indication globale de l'insaturation des corps gras (présence d'acide gras insaturé).Cependant, la valeur la plus élevés est également enregistrée dans l'échantillon du Smen (13,13), alors que pour les trois autre échantillons il est respectivement de 10,32 pour l'huile d'olive et de 9,38 pour le beurre et l'huile de soja.

Il est important de connaitre le degré d'insaturation d'une huile afin de les classer. Les huiles destinées à l'assaisonnement sont connue par un taux élevé d'insaturations et les huiles de friture sont plus saturées.

L'indice d'iode est un paramètre qui permet d'estimer la qualité d'une huile. Alors, L'huile d'olive analysé illustre un résultat d'indice d'iode très faible, par apport à une huile récente qui peut présenter un indice d'iode aux périmètres de 75 à 95 selon CODEX ALIMENTARUIS, (1989). Les travaux de MARTIN et WOLF, (1933), prouvent des modifications chimiques de la matière graissent par l'oxydation, provoquant l'augmentation d'indice d'acidité et diminution d'indice d'iode.

Chaque huile a un indice d'iode spécifique, qui est limité de 125 à 138 pour l'huile de soja qui est mesuré par la méthode de au réactif de Wijs (PIRSON *et al*, 2004). Le résultat obtenu dans notre expérience est excessivement faible 9.38 qui sont inférieur à

celle donné par le codex STAN 210-1999. Alors, on peut interpréter les résultats obtenu par la richesse des huiles analysés en acide gras saturé ou libre due aux mauvais conditionnements.

La valeur d'indice d'iode obtenue pour l'huile d'olive est remarquablement basse par rapport aux normes fixées par le COI 2006 qui prévoient des valeurs comprises entre 75 et 94.

7.3. Dosage des glucides dans un jus d'orange en utilisant l'acide 3.5 dinitrosalycilique (DNS)

Les teneurs en sucre dans quelques jus commercialisé sont présentées dans l'histogramme suivant :

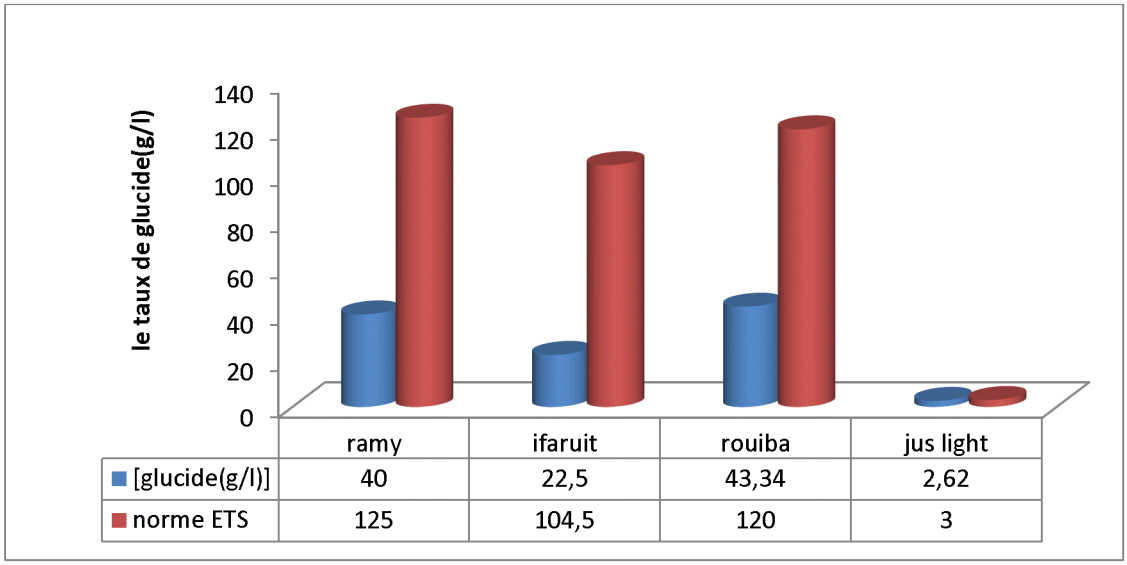


Figure 17 : comparaison de la teneur en glucide dans les jus de fruit analysés.

Les résultats obtenus montrent une variation importante dans les concentrations en glucide pour les différents jus commercialisés. Le jus *Rouiba* donne une concentration en glucide de 43.34 g/l, sa bonne conservation serait du a son emballage en Tetrapak qui lui confère une bonne résistance à l'oxydation et à la lumière, toutefois Le jus *Ramy* en bouteille présente aussi une concentration élevée de 40 g/l, son aspect visqueux et sa richesse en pulpe naturelle font que sa teneur soit élevée quant à *iFruit*, il est moyennement concentré de 22.5g/l, et en dernier lieu le jus *Rouiba Light* qui doit être normalement exempté de sucres se présente avec une valeur de 2.62 g/l, donné certainement par les édulcorants ajouté à la recette.

En effet, pour la comparaison des concentrations exigées par l'entreprise dans les différents jus élaborés, on constate une diminution plus au moins importante pour tout les jus, a l'exception du jus light qui conserve plus au moins sa teneur originale.

Les facteurs influençant sur cette diminution sont les conditions de stockage et de transport de chaque échantillon, le type d'emballage pourrait aussi intervenir dans ce paramètre. Les phénomènes d'échange entre le produit alimentaire et son emballage, sont le résultat des interactions existant entre la matrice, l'emballage et son environnement, entraînant des effets sur le produit et /ou l'emballage (HOTCHKISS, 1997).et d'après

LANGE et WYSER, (2003), Un aliment très sensible à l'oxygène devrait donc être emballé avec un matériau barrière à l'oxygène, donc préférentiellement avec le PET par rapport aux polyoléfines (PE, PP). Ainsi, pour améliorer la performance des emballages vis-à-vis du maintien de la qualité de l'aliment, des emballages multicouches ont été élaborés.

La méthode de dosage par la gamme étalon en utilisant le DNS témoigne à chaque essai une fiabilité intéressante, tout de même elle nécessite une bonne maitrise du protocole et une quasi totale réduction des erreurs de manipulations dans le but d'avoir des résultats juste et cohérents.

En plus de cette méthode, la science a mis à notre disposition d'autre protocole et appareils plus précis et plus pratique, exemple la méthode de SOMOGYI qui permet de réaliser des microdosages lorsque les quantités en glucide sont trop faible comprises entre 0.01 et 3 mg, alors que par la méthode de Bertrand, il faut au minimum 10 mg par prise d'essai (ANONYME, 1963). En plus des méthodes enzymatiques visant directement quelques glucides spécifique (Méthode de Boehringer), des méthode chromatographiques moderne plus sophistiqué comme l'HPLC, CCM...permette de doser même dans certaines tissus végétaux (RERAT, 1956).

7.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

TABLEAU VIII: Comparaison de la teneur en protéines dans le lait de vache et le jus lacté(Soummam)

Echantillon	Lait de vache	Jus lacté (Sommam)
Concentration (g/l)	11	19

Le taux des protéines dans le lait et dans ses différentes fractions est dosé par l'emploi de la méthode calorimétrique de LOWRY(1951), en utilisant l'albumine sérique bovine comme protéine de référence. On a obtenues des DO a une longueur d'onde de 750 nm qui vont permettre de déterminer les concentration des échantillons analysés en se référant a une courbe d'étalonnage DO=f(c) (figure 09)

Lors de notre expérimentation, on a effectué le dosage des protéines d'un échantillon lait de vache par deux groupe, le premier qui est le notre a obtenu une concentration très élevé 0.71 qui est une valeur inconvenable, on pourrait expliquer cet écart à une erreur de manipulation ou à une mauvaise dilution, le deuxième groupe a obtenu une concentration de 0.11 qui est relativement convenable mais au dessus des normes requises 32g/l.

La teneur protéique varie d'une semaine à l'autre, et d'une manière générale, a tendance a baisser au cours de la période de collecte considéré, Ceci peut s'expliquer par le fait que durant la saison de pâturage, la composition du lait est sous la dépendance des effets saisonniers (diminution du taux lors des longs jours), et du niveau d'alimentation (HODEN et COULON, 1991).

De nombreux auteurs montrent que le régime alimentaire entraine aussi des fluctuations dans les taux protéiques. En effet selon DALABY (1994), un régime a base de blé a induit un accroissement modéré du taux protéiques du lait de vache par apport a un régime a base d'herbe conservé ou pâturée. Il précise que le taux butyreux est amélioré lors d'apport de concentrées en quantité plus importantes. Quand a la composition, elle varie en fonction des stades de lactation.

Le résultat de dosage des protéines se référant a la courbe d'étalonnage pour le jus lacté a donné une concentration de (19 g/l), celle-ci serai due probablement à la poudre de lait ajouté lors du processus de fabrication.

La méthode de LOWRY bénéficie d'une meilleure sensibilité que la méthode de BUIRET (augmentation d'un facteur de cent). Il est ainsi possible de réaliser des mesures dans des mélanges pauvres en protéines ou des solutions relativement diluées.

Toute fois, elle présente l'inconvénient d'être moins fiable à cause des interférences possible dues aux réactifs. De plus, elle nécessite un certain temps de mise en œuvre. A coté a cette de méthode d'autre protocole peuvent être employés citons la méthode de BRADFORD, ainsi que KJELDAHL.

7.5. Isolement des séroprotéines par chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200.

Afin de purifier une fraction de protéines bovine et cameline, on a effectué une chromatographie de perméation sur gel, la phase stationnaire est constituée de SEPHACRYL S200 qui est un gel d'une grande stabilité et d'un domaine de fractionnement important situé entre 5.10^3 et $2{,}5.10^5$ Da. Le volume mort est mesuré à 17ml avec du bleu de Dextrane. Quant au débit de pompage de la solution tampon Tris /HCl, il est à 1.5 ml/min. Apres passage dans le détecteur de la solution tampon échantillon, on a effectué une récupération d'un volume de 2ml dans des petits tubes.

Le profil chromatographique obtenu dans la purification des protéines sériques du lait de vache est illustré par la figure 18 On le caractérise par l'obtention de quatre zones d'absorption correspondantes à quatre fractions éluées : F'1, F'2, F'3, F4.

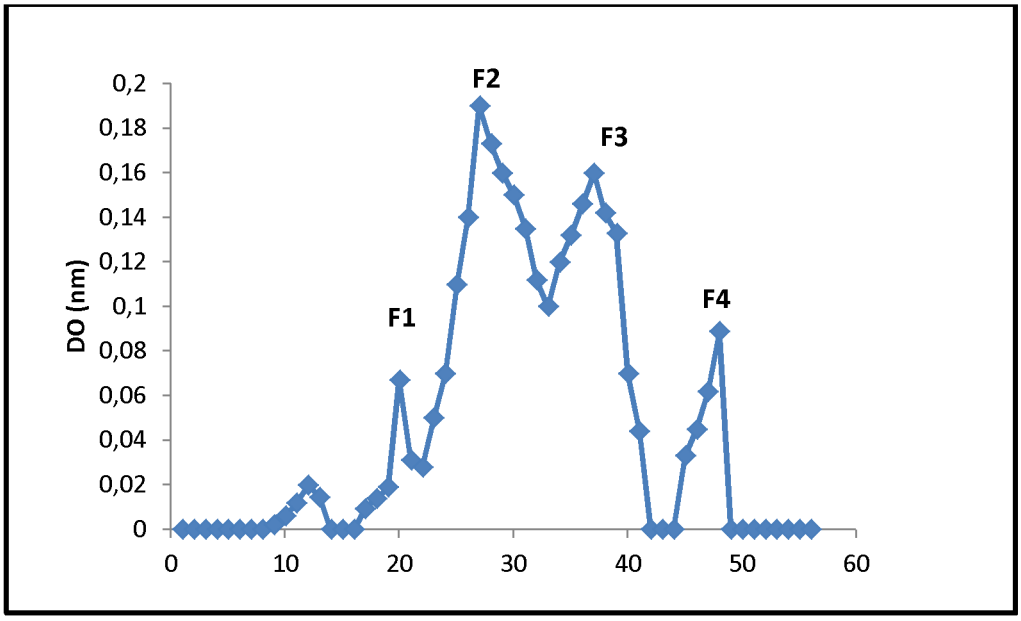


Figure 18 : Chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur gel SEPHACRYL S200.

Le profil chromatographique de fractionnement des séroprotéines du lait de chamelle est caractérisé par la mise en évidence de quatre fractions qui sont F'1, F'2, F'3, F'4 (Figure 19).

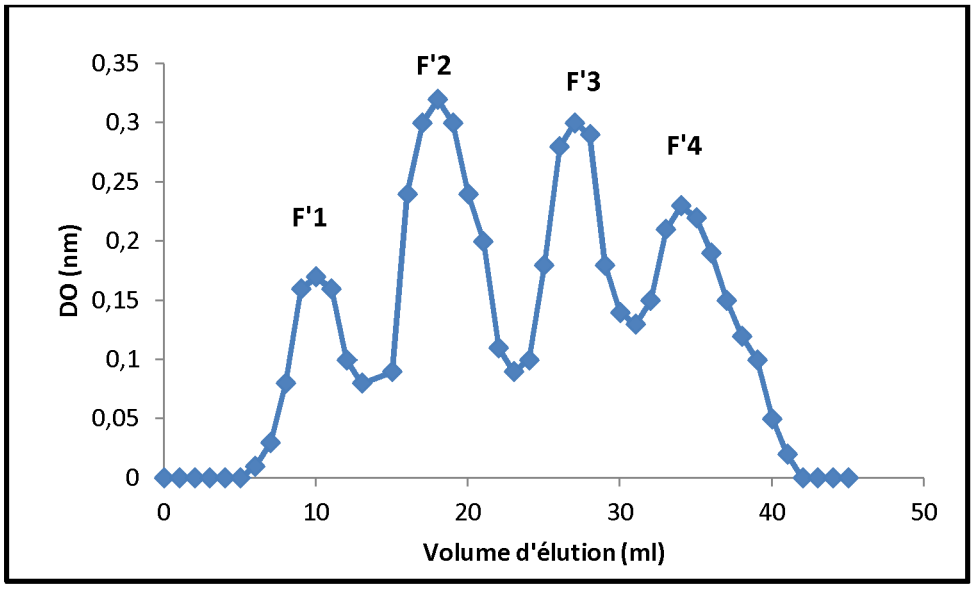


Figure 19 : Chromatogramme des protéines sériques du lait de chamelle sur gel SEPHACRYL S200.

Le protocole utilisé dans cette étude est intéressant, cependant la séparation des protéines sérique avec une pureté plus élevé impose le recours à d'autres méthodes chromatographiques plus fines (Chromatographie d'affinité, HPLC …) (SENOUSSI, 2001).

7.6. Isolement et caractérisation electrophorétique des caséines bovine et de l'ovalbumine de l'œuf en conditions dénaturantes (PAGE SDS) après hydrolyse enzymatique par la papaïne

La PAGE SDS est une technique particulièrement adaptée à la résolution des groupes protéique à forte association, en effet, selon GROSCLAUDZ et al, 1987 elle est d'un grand intérêt dans la détermination, des nombreuses variantes génétiques mis en évidence pour les caséines. Les agents dissociant, SDS et 2- mercaptoéthanol rompent respectivement les liaisons hydrogène et disulfure, ce qui permet de réduire les interactions entre les différentes sous unités des protéines te de migrer sous leurs poids moléculaire (MOUALEK, 1999)

Avant d'effectuer une mise en évidence avec l'électrophorèse PAGE SDS en conditions dénaturante, on a réalisé une catalyse des caséines du lait de vache et de l'ovalbumine de l'œuf avec la papaïne en optimisant le pH à 6.4 la température à 40°C. Les hydrolysats des caséines sont T, H1, H2, H3, H4, correspondant respectivement T=0min, T=15min, T=30min, T=60min. Quant aux hydrolysats de l'ovalbumine de l'œuf, on les a nommés ainsi T', H'1, H'2, H'3, H'4 dans un suivi temporelle équivalent au précédent.

Les résultats de l'électrophorèse sont illustrés dans les profils electrophorètique suivant :

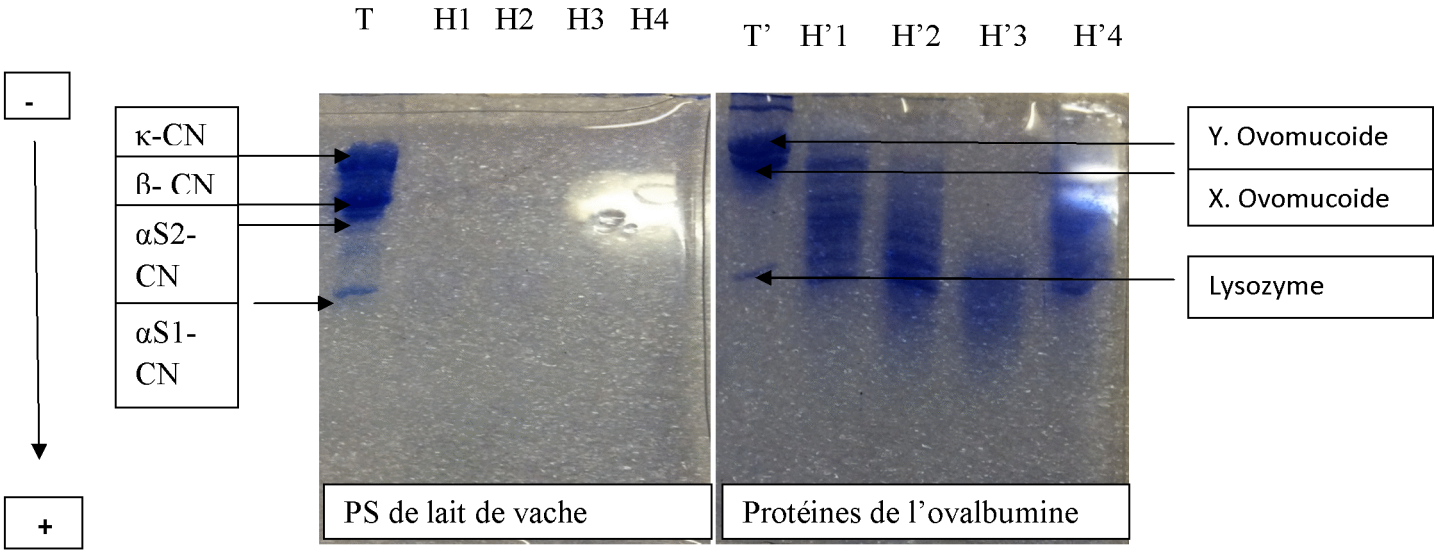


Figure 20 : Profils electrophorétique des hydrolysats (caséines lyophilisées du lait de vache et de l'ovalbumine de l'œuf) en PAGE SDS ; Gel de concentration (T= 4.8 et C= 2.7), gel de séparation (T=17% et C=2,7%).

Dans le profile electrophorétique correspondant au lait de vache, on ne constate, aucune bande, cela tend à dire qui il n'existe dans les hydrolysats, aucune molécule complexe capable de se fixer au, gel et d'être observe. La dégradation par la papaïne dans cet échantillon est une hydrolyse totale.

Si l hydrolyse totale des protéines ne s'est pas présenté la migration des caséines du lait de vache se ferait selon ALLIAS (1984) par l'ordre suivant : αS1 αS2, β, κ caséine dont es masses moléculaires sont généralement de 23.60, 25, 25, 24 et 19 kDa respectivement. Les travaux de PARDO et NATA LUCCI (2002) et LEBARS et GRIPON (1993) ont montré un agencement des caséines αS1, αS2, β. Les caséines β et αS1 se focalisent distinctement alors que la caséine αS2 migre en une bande diffuse. Le même résultat est obtenu par MOUALEK, 1999.

Selon BOUMAHROU *et al*, 2009. Une différence entre les valeurs réelles et expérimentale peut être expliquée par deux phénomènes. L'un étant la forte association des caséines ce qui leur confère ainsi un poids moléculaire plus élevé leurs poids moléculaire réel ceci se traduit par une faible migration en PAGE-SDS. L'autre est la faible fixation du SDS aux caséines, cette caractéristique est aussi remarquée pour les caséines d'autres espèces.

En ce qui concerne l'albumen de l'œuf, l'hydrolyse est conjointement partielle, on constate dans le témoin H'1 une condensation deux bandes et une troisième bande qui a migré un peu plus que les autres. La première bande pourrait s'agir de Y ovomucoide, la deuxième de X ovomucoide, leur poids moléculaires se limite entre 35 et 45 kDa, quant à la troisième bande, on pourrait suggérer que c'est du lysozyme de poids moléculaire similaire à 14 kDa. L'évolution de l'hydrolyse dans les puits H'2, H'3, H'4 démontre un fractionnement important des protéines du blanc d'œuf par la papaïne, ce pendant l'identification de celle-ci est impossible pour l'absence de kits marqueurs de poids.

Les protéines du blanc d'œuf se répartissent en 13 familles, elles ont été largement étudiées et extraite, en raison de leurs nombreuses propriétés nutritionnelles, techno-fonctionnelles et biologiques. Malgré cela, la composition en protéines, et notamment celle en protéines mineures n'est certainement pas complètement achevée puisque de nouvelles protéines viennent d'être mises en évidence. (LI-CHAN et NAKAI, 1989)

On peut expliquer cette différence de résultat par le fait que les caséines présente une structure désorganisé et une sensibilité à la chaleur ce qui a facilité la dégradation à l'enzyme par contre l'albumen de l'œuf se caractérise par une structure globulaire plutôt stable et une tendance à résister à des températures élevée d'où l'obtention de bandes protéiques distinctes.

L'incohérence des résultats de l'électrophorèse PAGE SDS illustre des défaillances au niveau de l'hydrolyse enzymatique qui pourrait être corrigé par une optimisation du rapport Substrat/ Enzyme et d'une diminution du temps de latence à une durée inferieur à 5 min et aussi une bonne maitrise de la durée d'incubation.

7.7. Isolement et caractérisation des séroprotéines bovines et camelines en conditions natives (PAGE native) :

L'électrophorèse PAGE native est une technique de révélation et de séparation des protéines selon leur charge électrique et leurs poids moléculaire. La mise en évidence est faite sur gel polyacrylamide sous forme de bandes de migration variant par leur position et leur intensité. L'électrophorèse en PAGE Native permet de garder les protéines dans leur état

natif, ce qui fait de la PAGE Native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques du lait bovin (MATI, 1992).

Les fractions récupérés de la chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200 qui sont les protéines sériques bovines F1, F2, F3, F4, T et les protéines lyophilisés du lait de chamelle F'1, F'2, F'3, F'4 sont toutes illustrés dans la figure 21

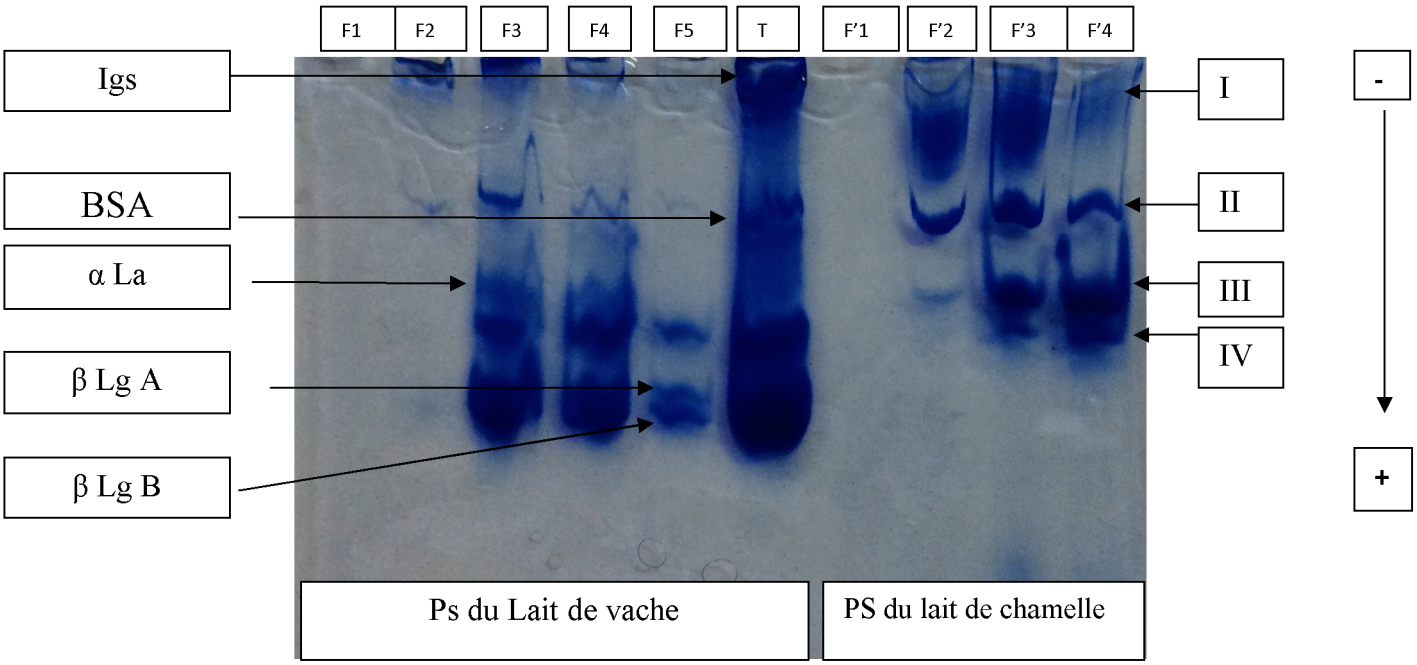


Figure 21 : Electrophorégramme des séroprotéines bovines et camelines en PAGE NATIVE ; gel d'électrophorèse T= 12% et C=2.7%).

Les protéines sériques du lait de vache dans des conditions natives migrent en cinq bandes dans l'ordre croissant de leur mobilité electrophorètique aux immunoglobulines, le composant trois des protéose peptones, le sérum albumine bovine, l'alpha-lactalbumine et enfin de migration la beta-lactoglobuline. (KINGSBURY et GAUNT, 1967 ; EGITO *et al*, 2001 ; ERIKSEN *et al*, 2010)

Pour le tube témoin T, le profil electrophorétique montre la présence de 4 bandes significatives. On peut les classer selon leurs degré de migration ainsi : Une première bande des Igs car ce sont ceux qui se déplacent le moins sur le gel vu leurs poids moléculaire très élevé qui ne leur permet pas de migrer plus loin suivi du Sérum Albumine Bovin (BSA), puis l' Alpha lactalbumine (α-La) et enfin la Beta lactoglobuline (β-Lg) qui a le niveau de migration le plus grand ; elle représente la principale protéine du lactosérum du lait (bovin, ovin et caprin). Notre résultat concorde avec les études de SIAHMED, (2009) et aussi SENOUSSI, (2012).

Dans la fraction F3 et F4 on a obtenu 4 bandes correspondante à celle du tube témoin, cela tend à dire que les tubes contiennent les 4 types de séroprotéines du lait de vache. A partir de la fraction F5, on constate l'absence de la bande correspondante aux Igs, une fine bande de BSA et on peut distinguer clairement les deux variantes de β- Lg et β-Lg ; ce résultat est probablement un début de purification. Quant aux fractions F1 et F2, l'électrophorèse n'a pas révélé de bandes apparentes en dépit des pics enregistrés lors de la chromatographie. L'absorbance pourrait être faite par des sels minéraux présents dans l'échantillon ou tout simplement par la solution tampon en d'autres termes il s'agit de contaminants.

Dans l'échantillon du lait de chamelle, la fraction F'3 et F'4 montrent une bande I qui se trouve au même niveau que les Igs, elle pourrait être son homologue camelin, en second lieu une bande II au même niveau que la BSA, il s'agirait de CSA (Sérum Albumine Cameline), la bande III est αLa cameline, la bande IV n'a pas d'homologue, elle pourrait être αLa cameline, en effet les travaux de CONTI *et al* , 1985ont prouvé la présence de deux forme génétique de l'α La cameline. Ces deux variantes différèrent dans leur pHi (estimé à 5.1 et 5.3). Le puits F'1 est caractérisé par une absence totale de bandes quant au puits F'2, on remarque que la bande correspondante aux αLa cameline sont absente, des erreurs de manipulation serait la cause.

Conclusion

L'alimentation a souvent été la cause d'apparition de plusieurs maladies nuisible à la santé humaine, en effet les denrées alimentaires sont plus au moins facilement altérables et engendrent des épidémies touchant parfois des sociétés complètes provoquant ainsi des crises qui s'étalent dans certains cas sur des années.

La vigilance et la bonne maitrise des processus de fabrication sont d'un emblème majeur. A cela s'ajoute un bon contrôle des denrées commercialisées tant au stade de sa conception comme matière première qu'à celui d'une production à l'échelle industrielle allant jusqu'à la confirmation du respect de la chaine de froid.

La mobilisation du personnel scientifique vis-à-vis de l'évolution des méthodes et des matériels du laboratoire est d'un grand essor et aujourd'hui le nombre d'analyse effectué sur un produit alimentaire ne cesse d'augmenter et la sensibilité des démarches employées sont particulièrement convaincantes, d'une haute technicité.

Les analyses effectuées au sein du laboratoire LABAB sont l'aperçu des contrôles entrepris par le secteur agroalimentaire algérien dans le but de parfaire la qualité, elles nous renseignent tout autant sur l'aspect organoleptique, que physicochimiques du produit élaboré.

Concernant le dosage de la vitamine C dans les jus commercialisées, on constate des variations considérables, le jus Ramy en bouteille a, en effet la plus grande concentration 330 mg/l. On pourrait expliquer ces différences de variations par des facteurs liés aux fruits de base tel le stade de maturation, les conditions de culture, le temps, la température de stockage, la méthode d'extraction et de dosage.

Les degrés d'acidité dans les échantillons analysés présentent des valeurs conformes aux normes imposées par la réglementation, cet indice nous informe longuement sur les conditions de traitement des graines et fruits oléagineux. Quant à l'indice d'iode, on a enregistré un taux important avec l'échantillon du smen qui est une huile élaboré spécialement avec de l'huile de palme et de soja ; le beurre qui est une matière grasse exclusivement d'origine animale représente le taux minimal de 9.38. On déduit alors que l'origine de l'huile est déterminante pour l'indice d'iode, en effet la matière grasse d'origine végétale possède un nombre supérieur en insaturations contrairement à la matière grasse d'origine animale qui est plutôt riche en acide gras saturés.

Le dosage des glucides dans un jus de fruit est déterminants car ils sont responsables de la saveur du jus et influent sur sa consistance et ses propriétés rhéologiques. De plus, ils ont une influence remarquable sur les constituants volatiles du jus (AHMED *et al.* 1978). La quantité la plus élevée en sucres réducteurs est obtenu avec le jus Rouiba en boite Tetrapak avec une valeur de 79.3 g/l.

La méthode de Lowry (1951) a révélé une concentration faible pour le lait de vache équivalente à 11 g/l, cette baisse de concentration a une interaction avec les conditions d'élevage de l'animal de traite, un mauvais apport en protéine alimentaire ou un nombre

important d'accouchement, tout de même une dénaturation par un traitement thermique est la cause principale de la baisse de la teneur en protéines spécifiquement les protéines sériques.

Le fractionnement des séroprotéines du lait de vache et de chamelle par la chromatographie de perméation sur gel SEPHACRYL S200, a révélé la présence de 4 pics correspondant aux fractions F1, F2, F3, F4, F'1, F'2, F'3, F'4 respectivement, au niveau des deux échantillons.

L'hydrolyse enzymatique par la papaïne effectuée pour les deux échantillons de caséines de lait de vache et d'ovalbumine de l'œuf a démontré une différence dans le comportement de ces deux types de protéines en présence de la papaïne et de la chaleur définie, en effet les caséines qui ont une structure désorganisé sont totalement dégradées tandis que l'ovalbumine de structure stable a résisté aux chaleurs subites.

La révélation de la composition des échantillons purifiés par la chromatographie sur gel de perméation et l'hydrolyse enzymatique par la papaïne est faite par l'électrophorèse PAGE Native et PAGE SDS.

Une bonne conformité des résultats finaux aux normes régit par la réglementation mondiale et algérienne classe le produit comme sain, salubre, d'une bonne qualité organoleptique, répondant aux exigences du consommateur.

ABIDI K. (2004). Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson, Thèse: Médecine vétérinaire, Ecole Nationale de Sidi Thabet, Tunisie.

ABIOLA.A, DIOP.M, TEKO-AGBO.A, DELEPINE.B, BIAOUF.C, ROUDAUT.B, GAUDIN.V, (2005). Résidus d'antibactériens dans le foie et le gésier de poulets de chair dans les régions de Dakar et de Thiès. Revue Méd.Vét. 156 (5) : 264-268

AFNOR. (2000). Institut of medicine, food and nutrition boad. dietary reference INTAKES for vitamin C, vitamin E and carotenoids.

AFNOR. **(2006)**. Rapport d'étude préliminaire pour la validation AFNOR du Premi Test. Code d'étude: VV

ALAIN R., (1956). Méthodes de dosage des glucides en vue du calcul de leur valeur énergétique (1). Annales de zootechnie, **5 (3)**, pp.213-236.

ALAIS C., LINDEN G., et MICHEL P. (2008). Biochimie alimentaire, Dunod, 6éme Ed., 86-88, Paris.

ANASTASI G., CINQUINA L., COZZANI R., GIAMMETTI L., et LONGO F. (2003).validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of Oxytétracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, revue: journal of chromatography A **987**, P.227-233.

ANONYME, (1963). Méthodes d'analyses utilisées en laboratoire des glucides. Office de la recherche scientifique et technique ; outre-mer .centre scientifique et technique, Bondy. p15.

ASSELINEAU J. (2008). Les antibiotiques: structure et exemples de mode d'action. Edition Hermann, Michigan, p 21.

BARGANSKA Z., NAMIESNIKA J., SLEBIODA M. (2011). Determination of antibiotic residues en honey, Trends in Analytical Chemistry; n°7, **30**. 1035-1040.

BARTHOLAMEN M., FERNANDEZ A.H., LOURENTIE M., PERRIN-GUYOMARD A., POUL J.M., et SANDERS P. (2006). Impact of ciprofloxacin in the human-flora-associated (HFA) rot model: comparison with the HFA mouse model. regal toxicol pharmacol,**45**, p 66-78.

BERCHE P.(1991). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. Médecine-science ; Edition Flammarion, Paris.

BERLINET C. (2006). Étude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité du jus d'orange. École nationale supérieure des industries agricole et alimentaires (ENSIA) .thèse. France. p 26.

BERNARD A. (2003). Nitrofurans residues in Belovo egg products: evaluation of the health risks for the Consumer. Rapport d'expert, University Catholique de Louvain (Belgique). p3.

BERTHELOT X., DE BOISSESON M., FABRE J.M., GARDEY L., et LHERBETTE L. (2000).Détection des résidus de Céfalexine dans le lait en cas d'allongement de la durée du traitement par voie intramammaire, Revue de médecine vétérinaire, n°151, 965-968.

BOCKRIS J. O. M., CONWAY B. E., SARANGAPANI S., et YEAGER E. (1983). Comprehensive treatise of electrochemistry. Plenum Press, New York. 59.

BOISSEAU J., CORPET D.E., COTTIN S., PERRIN-GUYOMARD A. et POUL J.M. (2001).evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. Regal toxical pharmacol, **34**, 36-125.

BOUDENE C.L., PEPIN G. (1977). Traitement des femelles laitières par voie galactophore a l'aide d'une nouvelle pénicilline semi synthétique. Revue : recueil de médecine vétérinaire, n°153, 565-571.

BOULTIF L. (2009). Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans le lait par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), Mémoire de Magister en Médecine vétérinaire, Université Mentouri de Constantine, Algérie.

BOUMAHROU N., ANDREI S., MIRANDA G., HENRY C., PANTHEIR J. MARTIN P. et BELLIER S. (2009). The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools. *Journal of physiology and Pharmacology.* 113-118.

BOURGEOIS C. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Edition Tec & Doc, Lavoisier.

BOUKOURAA A. (2012). Etude biochimique de l'adultération du jus de fruits ; Mémoire de Magister ; Université de Carthage ; Tunis.

BOUSQUET O., FABRE J.M., PETIT C. (2006). Extrait de livre : comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale. P 25-47.

BOUSQUET-MELOU A., CHOUVIN C., SANDRES P ET TOUTAIN P.L. (2011). Utilisation des antibiotiques en élevages et enjeux de santé publique. INRA, production Animale, 24**(2)**, 199-204.

BOUSQUET J., DEMOLY P., GODARD P., MICHEL B. (2000). Actualité des allergies médicamenteuses issues des antibiotiques et médicaments antirétroviraux, Bull. Acad. Nationale Méd, 184 **(4).** p761-774.

BRADDOCK R.J., RODRIGUEZ M., SADLER G.D., SIMS C.A., (1991). Chemical changes during storage of an alcoholic orange juice beverage. Journal of Food Science, **56 (2)**, 475-479, 493.

BRIBOSIA A., MARTIN C., PIRSON P., TADINO A., VAN ELSUWE R. (2004). Chimie 5e/6e. Science de base, édition deboack et larcier, Belgique.

BROUILLET P. (1994).maitrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait. Revue : recueil de médecine vétérinaire, n°170, 443-454.

BROUILLET P. (2002). Résidus de médicaments dans le lait et tests de détection, *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 15, p171.

BRYSKIER A. (1999). Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques, Edition Ellipses, Paris.

BRULE G., CROGUENEC T., ROMAIN J. (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière, Edition Lavoisier.

CARMAN R.J. & WOODBURN M.A. (2001). Effects of lane levels of ciprofloxacin on chemostat model o the human colonic microflora. Regal toxical pharmacol, 33**(3)**, 284-276.

CASEWELL M., COX T., DE GROOT B., FRIIS C., JONES R., NIGHTINGALE C., PHILLIPS I., PRESTON R. & WADDELL J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J Antimicrob Chemother, **53**, 28-52.

CHASLUS-DANCLA E., SCHWARZ, S. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance.Vet Res **32.** 201-25.

CHATAIGNER B., STEVENS A. (2005). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar. Institut pasteur de Dakar. P. 8-9.

CHEBARA B. (2009). Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans le miel par Chromatographie Liquide Haute Performance(HPLC), Mémoire de Magister en médecine vétérinaire, Université Mentouri de Constantine, Algérie.

CODEX STANA 210. (1999). Norme pour les huiles végétales portant un nom spécifique révision 2001, 2003, 2009 amandé 2005, 2001, 2013.

CONSUELO C.P., MARQUIERA A., et PUCHADES R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples; Trends in Analytical Chemistry, n° 9, **(29).** 1038-1048.

CONTIA., GODOUAC-ZIMMERMANN J., NAPOLITANO A. et LIBERATORI J. (1985). Identification and characterization of two α-lactalbumins from Somali camel milk (Camelus dromedaries). Milchewissenschaft, 40, 673-675.

COURVALIN P. (1998). Transfert de résistance. Le réseau, extrait de l'article antibiotique, alerte aux abus ! Revue : la recherche, n°314, p38-40.

DANHAIVE. P (1986). Détection d'antibiotiques de type B-lactames dans les viandes par la méthode Penzym, page 61-63. Annales de médecine vétérinaire (périodique mensuel), 4118, 1986, T.130, N° 1.

DANAN C. (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques AFSSA.

DEBACKERE M. (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in relation to their residues in milk. Proceedings du Symposium "Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk", in These ROMNEE J.M. (2009)

DELEPINE B., HURTAUD-PESSEL D., SANDERS P. (2002). Les méthodes récentes d'analyse physico-chimique des résidus d'antibiotiques dans le lait, *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 15, p191-196

DEMOLY.P, BOUSQUET.J, GODARD.P, et MICHEL.B. (2000). Actualité des allergies médicamenteuses issues des antibiotiques et médicaments antirétroviraux. Bull. Acad. Nationale Méd. 184 (4) : p761-774

DEREYNAL B., MULTON J.L. (2009). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaire, Lavoisier, Paris.

DIBNER J.J. AND RICHARDS J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action .poult sci., **84**, 43-634.

DJADOUN S. (2009). Influence de hexane acidifie sur l'extraction de l'huile d'olive assisté par micro-onde.*in* mémoire de magister. Chimie, chimie de l'environnement. UMMTO. p26.

DURRANI M.J., HUSSAIN B.H., KHAN R.N., SATTAR A. (1989). Effect of packaging materials and fluorescent light on HTST-pasteurized orange drink. Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und -Forschung, **188 (5)**, 430-433.

DUVAL. J, SOUSSY. C-J (1990). Antibiothérapie. 4éme édition, Edition Masson, page 3-58.

EDLUND C. et NORD C.E. (2000). Effects on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. J antimicrobien chemother 46 suppl. 1 A. p 41-8.

ELATYQY M. (2003). Sciences et technique des aliments. Lipides.

FABRE.J.M (2006). Comprendre et prévenir Les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. p 4.

FEDERICCI-MATHIEU C. (2000). Résidus dans le lait et sécurité alimentaire : quels risques ?quels moyens de maitrise ?, revue : bulletin des GVT, n°7, p21-22.

FERGUSSON J.P., BAXTER G.A., MAC EVOY J.D.G., STEAD S., RAWLING E., et SHARMAN M. (2002). Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor**,** *The Analyst*, 127, p951-956.

GATERMANN. R ET BRUNS .S (2004). Résidus d'antibiotiques dans l'alimentation humaine et animal : état des lieux et perspective, Revue : EUROFINS, n°15. Mai 2004, p. 2.

GAUDIN V., HEDOU C., SANDERS P. (2007). Validation of a Biacore method for screening eight sulfonamides in milk and porcine muscle tissues according to European decision 2002/657/EC. In These ROMNEE J.M. (2009).

GOGNY M., PUYT J-D. (2001).Classification des Principes actifs, Editions le point vétérinaire. p 2-6.

GOGNY M., PELLERIN J. L., PUYT J. D. (1999). Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire. (161-192) In: Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de Santé Animale: diagnostic, diététique, hygiène, petit matériel ; Maisons Alfort: Editions du Point Vétérinaire. p1659.

GONASI A., HELBO V., MAGHUIN-ROGISTER G. (2001). Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substance antimicrobienne dans les denrées alimentaires. Rapport final SSTC 1998-2001.université de liège. 7p.

GUILLEMOT. D (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Page 10-214.

GYSI. M (2006). Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003 et 2004, Revue : suisse Agric. n°38 (4), p. 215-220.

HALLIWEL, B. (1994**).** Vitamin C: the key to health or a slow-acting carcinogen. Redox report, Vol.1, pp. 5 - 9.

HODEN, COULON J.B. et DULPHY J.P (1985). Influence de l'alimentation sur la composition du lait. Effets des régimes alimentaires sur le taux butyreux et protéique. Bulletin Technique du centre de recherche zootechnique et vétérinaire. INRA. 62, 69, 79.

HOTCHKISS J.H. (1997). Food packaging interactions influencing quality and safety. Food Additives and contaminants, **14 (6/7),** 601-607.

HUET A.C., (2006). Simultaneous determination of fluoroquinolones antibiotic in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked ImmunoSorbent assay (ELISA). Journal of agriculture and Food Chemistry, **(54)**, 2822-2827.

IMAO (1998). Résidus de nitrofuranes dans la viande de p04let et les œufs. Thèse: Méd. Vét, Rabat, IAV.- 98p

ISSELNANE S. (2014). Caractérisation chromatographique et electrophorétique de l'extrait coagulant issu de caillette de dromadaires adultes. Mémoire de magister, Université de Mouloud Mammeri ; Tizi Ouzou, Algérie.

JEON.M, KIM.J, PAENG.J, PARK.S, PAENG.R, (2008). Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. Microchemical Journal. 88 (1), p26-31

KEHRENBERG C., SCHWARZ S., WALCH T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. International journal of antimicrobial agents. p 431-437.

KENNEDY D.G., MAC CRACKEN R.J., CANNAVAN A., et HEWITT S.A. (1998). Use of LC/MS in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk, *Journal of Chromatography A*, 812, p77-98

KESTMAN A-S. (2009). Influence des factures associes a une antibiothérapie de type méthaphylactique sur les relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) des antibiotiques. Conséquences sur les schémas posologiques et sur l'émergence de résistance. Thèse doctorat, Université de Toulouse. p 21-22.

KEZZAL K. (1993). Les antibiotiques : classification, mode d'action ; Office des publications universitaires, Alger.

KIOUBA J. (2003). Usage des antibiotiques en milieu hospitalier. Thèse, pharm. université de Bamako. p17.

KLEMM U. (2000). Appréciation toxicologique des résidus de sulfamides dans le miel. Lettre d'information n054 concernant les résidus de sulfamides dans le miel suisse. Berne : Office fédéral de la santé publique. p4.

LABIE C. (1981). Dispositions législatives destinés à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait, revue : recueil de médecine vétérinaire, n°157, P161-167.

LANASRI S., MAMMAR M., SADOUKI D., et SOBHI K. (2014). Potentiel érosif dentaire de la boisson consommée en Algérie. Laboratoire de toxicologie, hôpital central de l'armée-Alger. Algérie.

LANGE J., WYSER Y. (2003). Recent innovations in barrier technologies for plastic packaging – a review. Packaging Technology and Science, **16 (4)**, 149-158.

LARPENT J.P., ET SANGLIER J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques, Edition Masson, Paris, p 80,82.

LARRET-GARDE V. (1997). Enzymes en agroalimentaire, Tec & Doc, Edition Lavoisier.

LECLERC A *et al.* (1995). Microbiologie générale : La bactérie et le monde bactérien, Edition Doin.

LEITNER A., LINDNER W., ZOLLNER P. (2001). Determination of the metabolites of nitrufuran antibiotics in animal tissue by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A, 939 **(1-2).** P49-58.

MATI A. (1992). Les protéoses peptones dans les laits bovin, ovin et caprin : Isolement caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant -3. Thèse Doctorat, Université de Nancy I ; Paris ; France.

MAREZ, M., JEHL, B., MADET, N. (2004). L'acide ascorbique et son utilisation autant qu'additif dans les industries alimentaires. Université Paris XII, Val de Marne : Licence IUP SIAL, 23 p.

MARTIN G., WOLF C. (1933). Contribution à l'étude de l'auto-oxydation des graisses et les huiles servant à fabrication de la margarine. Le lait, **13(130)**, 1201-1214

MENSAH S.E.P., (2014). Les Résidus d'antibiotiques dans des denrées d'origine animale en Afrique : Risques de santé publique, Revue Scientifique et Technique, N°3, **(33)**, 1-27.

MERAD A.S., MOHAMEDI D., OUAR KORICH M.N.,YALA D. (2001). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb, **91**, 13-14.

MILHAUD G. (1985). Les résidus de chloramphénicol et leur toxicité. Ann. Rech.Vét, **16**,133-148

MOUALEK I. (1999). Caractérisation du lait de chèvre collecté localement : Séparation chromatographique et contrôles electrophorètique des protéines ; Mémoire de Magister ; Université de Mouloud Mammeri ; Tizi Ouzou ; Algérie.

MOATS W.A. (1984). Determination of penicillium G and Cloxacillin residues en beef and Park Tissue by high performance liquid chromatography, journal of chromatography, 317, p 311, 318.

NISHA R, **(2008).** Antibiotic residues – A global health hazard. Vet World, 1**(12)**. 375-7.

OXOBY M. (2002). Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques. p 3-12.

.

PERSON J.M. (1981). Influence des résidus d'antibiotiques sur la flore digestive du consommateur. Revu, semaine vétérinaire, n°203, p8.

REYBROECK. W (2004). Résidus d'antibiotiques dans le lait : Utilisation des kits de dépistage des inhibiteurs Revue : le Point Vétérinaire, n° 242, p. 52-57.

ROMNEE J.M. (2009). Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infrarouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait, Thèse en vue d'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques, Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Belgique.

SADOUKI, N., BOUDRICHE, A., KHENCHOUCHE, A., BENYACOUB, D., DJENNAOUI, T., BOUDRICHE, H., BANDOUI, D., HARROUZ, F ANDHAMLADJI, L., AYACHE, G., KEDDAD, N., et BOUGUERMOUH, A. (2010). Détection des papillomavirus à haut risque dans les lésions précancéreuses du col en Algérie ; état des lieux et perspective. *Arch Inst Pasteur Alger T 67* 53–82.

SANDERS P. (2005). Antibiothérapie dans le mode animal et conséquences chez l'homme sanitaire des aliments. Site de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments.

SANDERS P. (1999). Traitement thérapeutique et antibiorésistance. Le point vétérinaire 30**(188)** : p203-210.

SCIPPO M-L. (2008).technologie, sécurité et qualité des aliments introduction à la qualité et la sécurité des aliments. Aspect chimique, vétérinaires. Université de liège, faculté de médecine vétérinaire. p 2-36.

SENOUSSI C. (2011). Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien : essai de séparation et de caractérisation de la fraction protéose peptone ; Mémoire de Magister ; Université de Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou ; Algérie.

SI AHMED S. (2009). Isolement, purification et étude de la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait de dromadaire ; Mémoire de Magister ; Université de Mouloud Mammeri ; Tizi Ouzou ; Algérie.

STOLTZ R., (2008). Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : Evaluation et maitrise de ce danger. Thèse pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire, Ecole vétérinaire de Lyon, France.

VERHNES. R, VANDAELE. E (2002). Détection rapide des inhibiteurs dans le lait**,** Revue : le point vétérinaire, n° 227, Juillet-Août 2002, p. 16-17.

VIGNOLA C.L. (2002). Sciences et Technologie du lait, Fondation de technologie laitière du Québec.

WILLEM J.P. (2012). Antibiotiques naturels, Edition Sully ; Paris.

ZEGHILET N. (2009). Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans la viande blanche par Chromatographie Liquide Haute Performance(HPLC), Mémoire de Magister en médecine vétérinaire, Université Mentouri de Constantine, Algérie.

ZANETA. *(***2011).** Méthodes de dépistage, in Thèse « STOLTZ. (2008) ».

ZEIL J.M. (1988). Contribution a l'étude de l'incidence des résidus du thiabendazole sur les technologies fromagers .thèse, médecine vétérinaire, Lyon.

ANNEXES

Annexe 01 : Dosage de la teneur en vitamine C dans certains jus commercialisés.

1) Préparation des solutions :

- **<u>Préparation du DCPIP à 0.5 g/l :</u>**

  - Dans 300 ml d'eau distillé chaude dissoudre :

- 0.5 g de 2.6 dichlorophenol indophenol
- 0.2 g de bicarbonate de Sodium

  - Laisser refroidir et ajuster à 1000 ml d'eau distillé froide.

- **<u>Préparation de la solution d'acide ascorbique :</u>**

  - Dissoudre 0.4 g d'acide ascorbique dans 1 litre d'eau distillé

  - Homogénéiser et couvrir la fiole avec du papier aluminium pour éviter le contact avec la lumière.

2) Mode opératoire :

1er expérience : Etalonnage avec une solution d'acide ascorbique

- Prendre 5ml d'acide ascorbique dans un bécher
- Rajouter 1ml d'acide acétique glacial
- Titrer avec le DCPIP jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante.
- Noter le volume de titration V1 (ml)

2éme expérience : Dosage de la vitamine C dans les jus de fruit

- Filtrer ou centrifuger le jus pour éliminer les particules solides (pulpes)
- Prendre 5ml du jus dans un bécher
- Rajouter 1ml d'acide acétique glacial
- Titrer avec le DCPIP jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante
- Noter la chute de burette V2 (ml)

3éme expérience : Evolution de la teneur en vitamine C sous l'effet de la lumière et de la chaleur.

- Préparer une série de 4 tubes à essai **A, B, C, D**

Tube A : Laisser 15 min à température ambiante et exposer à la lumière ;

Tube B : Laisser 15 min à température ambiante et mettre à l'abri de la lumière ;

Tube C : Porter 15 min au bain marie à 40 C° ;

Tube D : Porter 15 min au bain marie à 80 C°.

- Mettre dans chaque tube 1ml d'acide acétique glacial
- Titrer avec le DCPIP jusqu'à l'apparition de la coloration rose persistante
- Noter les volumes correspondants du colorant ajouté.

3) Expression des résultats :

La détermination de la teneur en (g/l) de la vitamine C est donnée par la formule suivante :

$$C = \frac{C1 \times V1}{V}$$

C : Teneur en vitamine C en g /l
C1 : Concentration de la solution d'acide ascorbique (g/l)
V1 : Volume de DCPIP versé en ml
V : Volume de l'échantillon utilisé en ml

Annexe 02 : Détermination de l'indice d'acide dans une matière grasse

Mode opératoire :

- Peser 2.5 g de matière grasse dans un bécher puis les dissoudre dans 5 ml d'éthanol
- Ajouter 3 gouttes de phénophtaléine
- Titrer rapidement avec de la potasse alcoolique (0.1 N) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose persistante.

Expression des résultats :

Acidité (%) $= \frac{N \times V \times M}{m} \times 100$

M : Le poids moléculaire de l'acide oléique

V : Volume de KOH à 0.1 N utilisé pour la titration

m : La masse en gramme de la prise d'essai

N : Normalité de KOH

Annexe 03 : Détermination d'indice d'iode dans une matière grasse

1) Préparation des solutions et réactifs :

- **<u>Préparation de l'empois d'amidon :</u>**

- Dissoudre 1 g d'empois d'amidon dans 10 ml d'eau distillé froide puis le chauffer à T° = 90 C° ;
- Ajuster à 100ml avec de l'eau distillé

- **Préparation du thiosulfate de Sodium :**

- Calculer le poids en g correspondant à une normalité de 0.02 N dans un volume de 500 ml

$Na_2S_2O_3$ = 248.18g /mol

248.18g ⟶ 1 N

4.969 g ⟶ 0.02 N

4.969 g ⟶ 1000 ml

x ⟶ 500 ml

$x = \frac{500 \times 4.969}{1000} = 2.48g$

- Dissoudre 2.48g dans 500ml d'eau distillé

2) Protocole expérimentale :

- On prépare deux tubes à essai, un tube témoin qui contient du lugol seul et un autre contenant un échantillon d'huile et du lugol qu'on titre par la suite avec une solution du thiosulfate de Sodium ($Na_2S_2O_3$ à 0.02 N)

❖ **Tube témoin :** on le traite ainsi

- On verse 5 ml de lugol
- Quelques gouttes d'empois d'amidon (mélange bleu)
- Titrer avec le Thiosulfate de Sodium
- Noter V_1

❖ **Tube échantillon :**

- On verse 5 ml de lugol
- Ajouter 0.5 ml d'huile
- Quelques gouttes d'empois d'amidon (mélange bleu)
- Titrer avec le Thiosulfate de Sodium
- Noter V_2

3) Expression des résultats :

$$I(\mathrm{i}) = \frac{(V1-V0)\times 0.01269\times 100}{P}$$

(V_1-V_0) : Différence des résultats de titrage de l'essai à blanc et de l'essai avec corps gras

P : Poids de la prise d'essai exprimé en gramme

0.01269 : Nombre de gramme d'iode correspondant à 1 ml de thiosulfate

100 : Traduction en 100 g de corps gras

Annexe 04 : Dosage des glucides avec l'acide 3.5 dinitrosalycilique (DNS)

1) Préparation des solutions :

- **Préparation des dilutions :**

- On effectue 3 dilutions à 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} avec les proportions suivantes : 0.2 ml de l'echantillon dans 1.8 ml d'eau distillé

- **Préparation de la gamme étalon :**

- On calcule au préalable les concentrations en glucide dans les tubes :

C1 = 1 g /l V1= 0.2 ml
C2= x V2= 1 ml
X = C1 × V1/ V2

TABLEAU : Presentation de la gamme étalon de la solution de glucose

N° de Tube	**01**	**02**	**03**	**04**	**05**	**06**
Solution de glucose (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillé	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Concentration (g/l)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

- **Traitement des tubes :** On traite les dilutions et les tubes de la gamme étalon de la manière suivante :

- Ajouter 2ml du réactif (3.5 DNS) ;
- Chauffer au bain marie bouillant pendant 5 min ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7ml d'eau distillé et homogénéiser ;
- Laisser refroidir pendant 15 min à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530 nm contre le blanc ;

- **Réalisation de la courbe étalon :**

On trace une courbe d'étalonnage selon la DO de la solution de glucose DO= f(concentration de glucose) .

- **Tableau des densités optiques :**

Echantillon	01	02	03	04	05	06	10-2	10-3
DO(nm)	0	0.082	0.246	0.424	0.582	0.759	0.332	0.001

Annexe 05 : Dosage des protéines par la méthode de Lowry

- **Préparation des solutions :**

Solution A : Na_2CO_3 anhydre 2% dans NaOH à 0.1 M

- **NaOH 0.1N :** N=M (molarité)
- On a besoin de 50 ml :

  0.1 mol ⟶ 1000ml

  x ⟶ 50 ml x= 0.005 mol
- 1 mole de NaOH = 40g donc dans 0.005 mol il yaura 0.2 g
- On dissous 0.2 g de NaOH dans 50 ml d'eau distillé
- **Na_2CO_3 à 2% :**

  2g ⟶ 100ml

  1g ⟶ 50 ml

Solution B : 2ml de $CuSO_4$ $5H_2O$ 0.5% + 2 ml de tartrate de Na

A- 2ml de $CuSO_4$ $5H_2O$ 0.5% :

0.5 g ⟶ 100ml

0.1 g ⟶ 20 ml

Solution C : 1 ml A + 50 ml B

- **Préparation de l'échantillon :**

On va effectuer des dilutions 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} avec les proportions suivantes 0.5 ml de l'échantillon dans 5 ml d'eau distillé.

- **Préparation de la gamme étalon :**

N° de tube	A	B	C	D	E
Concentration (µg /ml)	0	30	50	80	100
Solution mère d'albumine sérique bovine (BSA) (µl)	0	150	250	400	500
Eau distillé (µl)	500	350	250	100	0

- **Expression des résultats :**

Une courbe étalon DO = f(C) est tracée. On détermine la concentration des protéines en se référant à celle-ci.

Tableau : Les densités optiques obtenues lors du dosage des protéines par la méthode de LOWRY, BSA utilisée comme protéine de référence.

Concentration (µg /ml)	0	30	50	80	100	10^{-3}
Densités optiques (nm)	0	0,017	0,057	0,109	0,135	0,071

Annexe 06 : L'électrophorèse sur gel polyacrylamide

❖ **Préparation des solutions :**

Pour la PAGE-Native :

Solution d'acrylamide

Acrylamide ……36 g

Bisacrylamide……1 g

Eau distillé ……100 g

Tampon de gel (B)

Tris……9.14 g

Eau distillé ……100 ml

Ajuster à Ph 8.9 avec de HCl 4N

Tampon d'électrode

Tris ……0.12 g

Glycine……0.58 g

SDS ……0.12 g

Eau distillé ……200 ml

Ajuster le Ph=8.3 avec Tris

Tampon d'échantillon

Tampon du gel (B) ……100µl

Eau distillé ……700µl

Glycérol 50%……200µl

Bleu de Bromophénol ……une tète d'aiguille

Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 1 ml de ce tampon

Préparation du gel : T=12% et C=2.7% (pour une plaque)

Solution (A) ……3.25ml

Solution (B)…… 5ml

Eau distillé ……1.68ml

Dégazer le mélange (maximum 2 min)

TEMED……..10µl

Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75µl

Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20Ma ,25 V

Fixation : 45 mn dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

- **Pour la PAGE –SDS :**

Solution d'acrylamide :
Acrylamide ……36 g
Bisacrylamide ……1g
Eau distillé ……100ml

Tampon de gel de séparation
Tris ……9.25g
Eau distillé ……50ml

Ajuster à 8.8 avec de HCL 4N

Tampon d'électrode

Tris ……3g

Glycine ……14.4g

SDS ……0.5g

Eau distillé ……500ml

Tampon d'échantillon

Solution(C) …… 500µl

Eau distillé ……..250µl

SDS (10%) ……..50µl

Mercaptoéthanol ……50µl

Dissoudre 1 à 2 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon Chauffage à 100°C pendant 4 à 5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide, Ajouter 100µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol.

Solution de fixation :

TCA……12 g

Eau distillé ……...100ml

Solution de coloration :

Bleu de Coomassie R250……0.5g

TCA…….. 4g

Méthanol ……..100ml

Eau distillé……100ml

Solution de décoloration

Acide acétique……37.5 ml

Eau distillée……312.5 ml

Méthanol ……150 ml

Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium……0.1 ml

Eau distillé……1 ml

Conduite de l'électrophorèse

Préparation du gel de séparation : T= 17% et C= 207% (pour une plaque)

Solution (A) ……4.60 ml

Solution (S)……2.51 ml

Eau distillé……2.73 ml

Dégazer pendant 2 min maximum

SDS 10%.....100µl

TEMED……13µl

Persulfate d'ammonium 10% ……75µl

Couler à environ 1.5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur

Préparation du gel de concentration : T= 4.8% et C= 2.7 % (pour une plaque)

Solution (A)……..1.3 ml

Solution (C)……..…2.5 ml

Eau distillé ……5.8 ml

Dégazer quelques secondes

Solution de SDS à 10% ……..……100µl

TEMED……20µl

Persulfate d'ammonium à 10% ……..…..10µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne.

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 250 V

Fixation : 45 minutes dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : Dans la solution de décoloration

Annexe 07 : Hydrolyse enzymatique

- **Préparation des solutions :**

- On dissous 2mg de l'échantillon dans le tampon d'échantillon
- On prépare la solution Tris/HCl 0.5M ; pH 6.4

- **Mode opératoire**

- Préparer les 5 tubes à essai dans les quels on a mis préalablement 200 µl du bleu de bromophenol
- Incubation de 4 tubes à essai à 40 C° après rajout de 25µl de l'enzyme
- Le 5ème tube est ni incubé ni additionné de l'enzyme
- Prélèvement d'aliquotes 200 µl d'hydrolysat additionné du même volume du tampon d'échantillon à des temps variables (0', 15', 30', 60', 120')
- Arrêt de la réaction par chauffage à 100 C° / 5min

Annexe 08 : limite maximales des résidus (LMR) des principaux antibiotiques (µg/kg ou ppm) (Fabre et al, 2006).

Molécule	Familles d'antibiotiques	LMR dans le lait (µg/kg)
L'acide Oxolinique	Fluoroquinolones	0
Amoxicilline	Bétalactamines	4
Ampicilline	Bétalactamines	4
Bacitracine	Polypeptides	100
Cefacetrile	Bétalactamines	125
Cephalexine	Bétalactamines	100
Cefalonium	Bétalactamines	20
Cefapirine	Bétalactamines	60
Cefazoline	Bétalactamines	50
Cefopérazone	Bétalactamines	50
Cefquinome	Bétalactamines	20
Ceftiofur	Bétalactamines	100
Chloramphenicol	Phenicolés	0
Cloxacilline	Bétalactamines	30
Colistine	Polypeptides	50
Chlortétracycline	Tetracycline	100
Danofloxacine	Fluoroquinolones	30
Streptomycine	Aminoglycosides	200
Dicloxacilline	Bétalactamines	30