

TD 9247

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DAKAR

\*\*\*\*\*

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES  
(E.I.S.M.V.)

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP  
Dakar  
BIBLIOTHEQUE

ANNEE 1992



N° 47

## RECHERCHE DE RESIDUS DE CHLORAMPHENICOL DANS LES VIANDES DES RUMINANTS EN COTE D'IVOIRE : MISE EN PLACE D'UNE METHODE ANALYTIQUE

### THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 JUILLET 1992 DEVANT  
LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE DAKAR  
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VETERINAIRE  
(DIPLOME D'ETAT)

PAR

**KONE Philippe SOUMAHORO**

Né le 13 Novembre 1965 à Abidjan (Côte d'Ivoire)

- Président du jury : Monsieur François DIENG  
Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar
- Directeur de thèse et Rapporteur : Monsieur François Adébayo ABIOLA  
Professeur Agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar
- Membres : Monsieur Malang SEYDI  
Professeur Agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar  
Monsieur Mamadou BADIANE  
Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar
- Codirecteur de thèse : Monsieur Djedjé DANOH  
Professeur Agrégé à la Faculté de Pharmacie d'Abidjan

## ANNEE UNIVERSITAIRE 1991 - 1992

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

## I. - PERSONNEL A PLEIN TEMPS

## 1 - ANATOMIE - HISTOLOGIE - EMBRYOLOGIE

Kondi	AGBA	Maître de Conférences Agrégé
Jacques	ALAMARGO	Assistant
Lahamdi	AMADOU	Moniteur

## 2 - CHIRURGIE - REPRODUCTION

Papa El Hassane	DIOP	Maître de Conférences Agrégé
Latyr	FAYE	Moniteur
Laurent	SINA	Moniteur

## 3 - ECONOMIE - GESTION

Hélène (Mme)	FOUCHER	Assistante
--------------	---------	------------

## 4 - HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (H.I.D.O.A.)

Malang	SEYDI	Maître de Conférences Agrégé
Papa Ndary	NIANG	Moniteur
Fatime (Mlle)	DIOUF	Moniteur

## 5 - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Justin Ayayi	AKAKPO	Professeur titulaire
Jean	LOUDAR	Professeur
Rianatou (Mme)	ALAMBEDJI	Assistante
Souaïbou	FAROUGOU	Moniteur

**6 - PARASITOLOGIE - MALADIES PARASITAIRES - ZOOLOGIE**

Louis Joseph	PANGUI	Maître de Conférences Agrégé
Jean-Carré	MINLA AMI OYONO	Moniteur
Fatimata (Mlle)	DIA	Moniteur

**7 - PATHOLOGIE MEDICALE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE CLINIQUE  
AMBULANTE**

Yalacé Y.	KABORET	Assistant
Pierre	DECONINCK	Assistant
Mouhamadou M.	LAWANI	Vacataire
Papa Aly	DIALLO	Moniteur

**8 - PHARMACIE - TOXICOLOGIE**

François A.	ABIOLA	Maître de Conférences Agrégé
Boubacar	DIATTA	Moniteur

**9 - PHYSIQUE - THERAPEUTIQUE - PHARMACODYNAMIE**

Alassane	SERE	Professeur titulaire
Moussa	ASSANE	Maître de Conférences Agrégé
Nahar	MAHAMAT TAHIR	Moniteur

**10 - PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUE ET MEDICALES**

Germain Jérôme	SAWADOGO	Maître de Conférences Agrégé
Moussa	TRAORE	Moniteur

**11 - PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

Gbeukoh Pafou	GONGNET	Maître Assistant
Ayao	MISSOHO	Assistant
Amadou	GUEYE	Moniteur

**II - PERSONNEL VACATAIRE****- BIOPHYSIQUE**

René NDOYE Professeur  
Faculté de Médecine et de Pharmacie  
Université Ch. Anta Diop de DAKAR

Alain LECOMTE Maître - Assistant  
Faculté de Médecine et de Pharmacie  
Université Ch. Anta Diop de DAKAR

Sylvie (Mme) GASSAMA Maître de Conférences Agrégée  
Faculté de Médecine et de Pharmacie  
Université Ch. Anta Diop de DAKAR

**- BOTANIQUE - AGROPEDOLOGIE**

Antoine NONGONIERMA Professeur  
IFAN - Institut Ch. Anta Diop  
Université Ch. Anta Diop de Dakar

**- PATHOLOGIE DU BETAIL**

Magatte NDIAYE Docteur Vétérinaire - Chercheur  
Laboratoire de Recherches Vétérinaires  
de Dakar

**- ECONOMIE**

Cheikh LY Docteur Vétérinaire - Chercheur  
FAO - BANJUL

D

**- AGRO - PEDOLOGIE**

Alioune            DIANE

Docteur Ingénieur  
Département "Sciences des Sols"  
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie  
THIES

**- SOCIOLOGIE RURALE**

Oussouby        TOURE

Sociologue  
Centre de suivi Ecologique  
Ministère du Développement Rural

**III - PERSONNEL EN MISSION**

**- PARASITOLOGIE**

Ph.                DORCHIES

Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE (France)

M.                KILANI

Professeur  
E.N.M.V. SIDI THABET (Tunisie)

**- ANATOMIE PATHOLOGIE SPECIALE**

G. VANHAVERBEKE

Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE (France)

**- ANATOMIE**

Y.                LIGNEREUX

Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE (France)

**- PATHOLOGIE DES EQUIDES ET CARNIVORES**

A.                CHABCHOUB

Professeur  
E.N.M.V. SIDI THABET (Tunisie)

E

**- PATHOLOGIE DU BETAIL**

Mlle A. LAVAL                      Professeur  
E.N.V. - ALFORT (France)

M. ZRELLI                              Professeur  
E.N.M.V. SIDI THABET (Tunisie)

**- ZOOTECHNIE - ALIMENTATION**

A. BENYOUNES                      Professeur  
E.N.M.V. SIDI THABET (Tunisie)

**- GENETIQUE**

D. CIANCI                              Professeur  
Université de PISE (Italie)

**- ALIMENTATION**

R. PARIGI-BINI                      Professeur  
Université de PADOUE (Italie)

R. GUZZINATI                      Docteur  
Université de PADOUE (Italie)

**- ANATOMIE PATHOLOGIQUE GENERALE**

A. AMARA                              Maître de Conférences Agrégé  
E.N.M.V. SIDI THABET (Tunisie)

**- CHIRURGIE**

A. CAZIEUX                              Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE (France)

# DEDICACES

- **Au Tout Puissant, DIEU, le Miséricordieux**

- **A Salimata TRAORE, in Memorium**

- **A mon Père KONE VANGBE et à ma Mère CURTIS Anne-Marie**

Vous avez toujours été présents à mes côtés. Ce travail est le vôtre, qu'il soit le faible témoignage de toute l'admiration que j'aie pour vous. Puisse Dieu vous donner la force de rester encore parmi nous pour que nous nous abreuvions encore de votre savoir.

- **A mes Frères :**

Pour tous les sacrifices consentis. Grâce à votre soutien et à votre affection, j'ai surmonté les difficultés. Demeurons unis, car ce n'est que dans l'union que réside notre force.

- **A ma Soeur Yvette**

Tu es ma seconde mère. Ce travail est le fruit de tes efforts, de ton abnégation et de ta persévérance. Les mots me manquent pour t'exprimer tout ce que je ressens.

- **A mes Neveux et Nièces**

Inspirez-vous de ce travail pour faire mieux que moi.

- **A mes Cousins et Cousines**

Sincère attachement.

- **A la famille YAO**

Vous avez été pour moi une seconde famille. Vos conseils et votre gentillesse m'ont toujours guidé vers le succès. Eternelles reconnaissances et profonde considération.

- **Aux familles AHYEE, DIAW et NANA**

Toute ma reconnaissance

- **A Fatimata DIA**

Tu as été à mes côtés durant toutes ces années.

Puisse Dieu exaucer ce que nous souhaitons tous les deux.  
Indéfectible attachement.



- **A la famille DIA**  
Votre accueil chaleureux m'a enthousiasmé. Sincères remerciements.
- **A tous mes Amis et Amies**  
ROBERT, ERIC, HENRI, MICHEL, CATHY, LYDIA, FAT CHEICK, DABA...
- **A tous mes collègues : GENEVIEVE, GERARD, ATHANASE**
- **A tous les Etudiants Ivoiriens à Dakar**  
NOEL, SOULEYMANE, ALFRED
- **A toute la 19<sup>ème</sup> promotion : "BIRAGO DIOP".**
- **A tous les Etudiants Vétérinaires de Dakar.**
- **A toute la Communauté Ivoirienne à Dakar.**
- **A mon pays, la Côte d'Ivoire**  
Pour les immenses sacrifices consentis à notre endroit.
- **Au Sénégal**  
Pays hôte, pour sa traditionnelle "Téranga".

**A NOS MAITRES ET JUGES**

**- A notre Président du Jury, Monsieur François DIENG**  
**Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar**

Vous nous faites l'insigne honneur de présider notre jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Soyez assuré que votre disponibilité et votre simplicité nous ont profondément marqué.

Hommages respectueux.

**- A notre Maître, Monsieur François A. ABIOLA**  
**Professeur Agrégé à l'E.I.S.M.V.**

Vous avez accepté de diriger ce travail en lui imprégnant toute la rigueur que l'on vous connaît. Votre amour pour le travail bien fait, votre expérience et votre raisonnement ont été pour nous un apport précieux et profitable.

Tous nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour nous.

**- A Monsieur Malang SEYDI**  
**Professeur Agrégé à l'E.I.S.M.V.**

C'est avec plaisir que vous avez accepté de faire parti de notre jury. Votre goût du travail, vos qualités sociales et professionnelles forcent l'admiration de tous les étudiants de l'E.I.S.M.V.

Sincères remerciements.

**- A Monsieur Mamadou BADIANE**

**Professeur agrégé à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de  
Dakar**

Malgré votre emploi de temps chargé, vous avez accepté de juger  
ce travail.

Nous vous assurons de notre profonde gratitude.

**- A Monsieur DANOH DJEDE**

**Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie d'Abidjan**

Ces quelques mois passés dans votre laboratoire, nous ont permis  
de constater votre disponibilité, votre sens du travail parfait et  
surtout vos qualités d'homme de science.

Soyez rassuré de notre admiration et de notre profonde  
reconnaissance.

# REMERCIEMENTS

- **Au Docteur Pierre AKA**  
Directeur des Services Vétérinaires de la Côte d'Ivoire  
Pour le soutien constant que vous apportez aux étudiants. Merci.
  
- **A Mme APHING-KOUASSI Nicole**  
Ingénieur Agronome au Laboratoire Centrale de Nutrition Animale (LACENA)  
  
Sans votre aide, ce travail n'aurait certainement pas vu le jour.  
Eternelle reconnaissance.
  
- **Au Docteur KOUASSI Monique**  
Responsable du Volet avicole à la SODEPRA Sud-Est.
  
- **Au Docteur DEA VASIN**  
Responsable du service Bactériologie du Laboratoire de Pathologie animale de Bouaké.
  
- **Au personnel des laboratoires de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie d'Abidjan et du laboratoire Central de Nutrition Animale.**
  
- **A Mme NDOUR Elisabeth, qui m'a aidée à rendre agréable ce travail.**

*"Par délibération, la Faculté et l'Ecole ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leurs seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation ni improbation".*

## LISTE DES TABLEAUX

Tab. 1 :	Constantes physiques du chloramphenicol.....	4
Tab. 2 :	Solubilité du chloramphenicol dans l'eau et différents solvants.....	4
Tab. 3 :	Les esters du chloramphenicol.....	6
Tab. 4 :	Absorption du chloramphenicol.....	6
Tab. 5 :	Données pharmacocinétiques après administration en IV de 22 mg/kg d'hemisuccinate de chloramphenicol.....	7
Tab. 6 :	Mode d'action des antibiotiques.....	12
Tab. 7 :	Spectre bacteriologique du chloramphenicol in "vitro".....	15
Tab. 8 :	Voies d'administration du chloramphenicol.....	20
Tab. 9 :	Affections utilisant du chloramphenicol et leur posologie.....	21
Tab. 10 :	Résidus en mcg/g et en mcg/ml de chloramphenicol trouvés chez le porc.....	27
Tab. 11 :	Détection des antibiotiques dans le lait. Méthodes microbiologiques en milieux liquides.....	38
Tab. 12 :	Dosages microbiologiques du chloramphenicol dans les milieux biologiques.....	40
Tab. 13 :	pH des milieux géloses et leur souche-test.....	41
Tab. 14 :	Récapitulatif de la méthode électrophorétique.....	45
Tab. 15 :	Limite de détection de quelques antibiotiques par CCM.....	48
Tab. 16 :	Echantillonnage selon la ville et l'espèce .....	59
Tab. 17 :	Temps de rétention du chloramphenicol dans du muscle de ruminants domestiques.....	64
Tabl. 18 :	Résultats des étalons de la Méthode UPLC utilisée.....	66
Tabl. 19 :	Etude du taux de récupération ou rendement d'extraction du chloramphenicol.....	70
Tabl. 20 :	Résultats chez les petits ruminants selon l'espèce.....	71



## LISTE DES FIGURES

Fig. 1	: Formule développée plane du chloramphenicol.....	3
Fig. 2	: Réduction de la fonction NO <sub>2</sub> du chloramphenicol.....	8
Fig. 3	: Biotransformation du chloramphenicol par les Microsomes du foie de rat.....	9
Fig. 4	: Règles générales de la combinaison des antibiotiques.....	24
Fig. 5	: Appareillage pour la migration électrophorétique.....	
Fig. 6	: Diagramme des étapes de la méthode colorimétrique.....	47
Fig. 7	: Séparation d'un mélange de 3 constituants par chromatographie .....	49
Fig. 8	: Schéma classique de l'HPLC.....	50
Fig. 9	: Courbe d'étalonnage du chloramphenicol .....	67
Fig. 10	: Chromatogrammes de l'étalon 4 de 15 mg/kg .....	68
Fig. 11	: Pourcentage de positivité des ovins.....	72
Fig. 12	: Pourcentage de positivité des caprins .....	73
Fig. 13	: Pourcentage de positivité des petits ruminants.....	74

## CARTE

Carte : lieux de prélèvements.....	58
------------------------------------	----

## ANNEXES

Annexe 1 : Fiche Résultats : Petits ruminants

Annexe 2 : Fiche résultats : Bovins

Annexe 3 : Chromatogrammes d'échantillons positifs

Annexe 4 : Chromatogrammes d'échantillons négatifs

Annexe 5 : Méthode HPLC de référence (C.N.E.V.A. (L.M.V.)  
Septembre 1990)

## INDEX DES ABREVIATIONS

h	: heures
HPLC	: High performance liquid chromatography ou chromatographie liquide de haute performance
CAP	: Chloramphenicol
IV	: Intraveineuse
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
g	: gramme
%	: pour cent
IM	: intramusculaire
SC	: sous cutanée
°C	: degré celsius
U.V	: ultra violet
C.C.M.	: chromatographie en couche mère
C.P.G.-S.M.	: chromatographie en phase gazeux - Spectromètre de Masse
Ag	: antigène
Ac	: anticorps
RIA	: radioimmunoassay
ELISA	: Enzyn Linked Immunosorbent Assay
CAP* ,	: Chloramphenicol marqué
ppm	: partie par million
ppb	: partie par billion
ARN	: acide ribonucléique
ARN <sub>t</sub>	: acide ribonucléique de transfert
G <sup>+</sup> et G <sup>-</sup>	: Gram positif et Gram négatif
Zn	: Zinc
CNEVA	: Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires
L.G.A.	: La Générale d'Alimentation
LACENA	: Laboratoire Central de Nutrition Animale
PW	: Peak Witch

# S O M M A I R E

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## PREMIERE PARTIE : LE CHLORAMPHENICOL : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE PREMIER : GENERALITES SUR LE CHLORAMPHENICOL .....	3
---	---

I - Classification - formule chimique .....	3
---	---

II - Propriétés Physico-chimiques .....	4
---	---

II.1.- Propriétés physiques .....	4
-----------------------------------	---

II.1.1.- Les constantes physiques .....	4
---	---

II.1.2.- Solubilité à la température ordinaire .....	4
--	---

II.2.- Propriétés chimiques .....	4
-----------------------------------	---

II.2.1.- Stabilité .....	5
--------------------------	---

II.2.2.- Réaction d'identification .....	5
--	---

II.2.2.1.- Due au groupement nitré .....	5
--	---

II.2.2.2.- Due à la présence du chlore .....	5
--	---

II.2.3.- Obtention des esters .....	5
-------------------------------------	---

III - Pharmacocinétique .....	6
-------------------------------	---

III.1.- Absorption .....	6
--------------------------	---

III.2.- Diffusion .....	7
-------------------------	---

III.3.- Biotransformations .....	8
----------------------------------	---

III.4.- Elimination .....	10
---------------------------	----

IV - Propriétés antibactériennes .....	10
--	----

IV.1.- Généralité sur les bactéries .....	11
---	----

IV.2.- Mode d'action .....	11
----------------------------	----

IV.3.- Spectre d'action .....	13
-------------------------------	----

IV.4.- Résistance bactérienne .....	14
-------------------------------------	----

V - Toxicité et effets secondaires .....	16
--	----

V.1.- Accidents sanguins .....	16
--------------------------------	----

V.2.- Accidents par immaturation métabolique .....	18
--	----

V.3.- Accidents nerveux .....	18
-------------------------------	----

V.4.- Accidents au niveau de la peau et des Muqueuses .....	18
---	----

V.5.- Autres effets secondaires .....	18
---------------------------------------	----

VI - Utilisations du chloramphenicol.....	19
VI.1.- Forme d'utilisation.....	19
VI.2.- Voie d'administration.....	19
VI.2.1.- Voie orale.....	19
VI.2.2.- Voie parentale.....	20
VI.2.3.- La Balnéation.....	20
VI.3.- Utilisations thérapeutiques.....	20
VI.4.- Autres utilisations.....	21
VI.5.- Les Associations avec d'autres médicaments.....	22

## **CHAPITRE DEUXIEME : PROBLEMES DE RESIDUS DE CHLORAMPHENICOL.....**

I - Présence de résidus de chloramphenicol dans les denrées.....	25
I.1.- Viande et abats.....	25
I.1.1.- Bovins.....	25
I.1.2.- Porcins.....	26
I.1.3.- Poulets de chair.....	26
I.1.4.- Poissons.....	28
I.2.- Oeufs.....	28
I.3.- Lait.....	28
II - Conséquences de la présence de résidus de chloramphenicol dans les denrées alimentaires.....	29
II.1.- Toxicité directe.....	29
II.2.- Fréquence accrue du développement des champignons pathogènes.....	30
II.3.- Sélection de souches microbiennes résistantes.....	30

## **DEUXIEME PARTIE : METHODES DE RECHERCHE DES RESIDUS**

<b>CHAPITRE PREMIER : LES CRITERES DE CHOIX D'UNE METHODE.....</b>	<b>33</b>
I - Les qualités d'une méthode d'analyse.....	33
I.1.- La précision.....	33
I.2.- La sensibilité.....	34
I.3.- La spécificité.....	34
I.4.- La détectabilité ou limite de détection.....	34
I.5.- Le taux de récupération.....	34
II - Choix de la méthode et objectifs.....	35

## **CHAPITRE DEUXIEME : PRESENTATION DES DIFFERENTES TECHNIQUES**

<b>TECHNIQUES</b> .....	37
I - Méthodes microbiologiques.....	37
I.1.- Principe.....	37
I.2.- Méthodologie.....	39
II - Méthodes électrophoretiques.....	42
II.1.- Principe.....	42
II.2.- Préparation de l'échantillon.....	42
II.3.- Réalisation.....	42
II.4.- Résultats.....	43
III - Méthodes colorimétriques.....	43
III.1.- Principe.....	43
III.2.- Mode opératoire.....	46
III.3.- Evaluation de la méthode.....	46
IV - Les méthodes chromatographiques.....	46
IV.1.- Chromatographie sur couche mince (C.C.M.).....	46
IV.2.- Chromatographie liquide de haute performante (H.P.L.C.).....	48
IV.3.- Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.).....	51
V - Les méthodes immunologiques.....	52
V.1.- Principe de la méthode radioimmunologique (R.I.A.).....	52
V.2.- Principe de la méthode E L I S A.....	53
VI - Dosage fluorimétrique.....	53
VII - Dosage par polarographie.....	54

## **TROISIEME PARTIE : RECHERCHE DE RESIDUS DE CHLORAM- PHENICOL EN COTE D'IVOIRE PAR LA METHODE H.P.L.C.**

<b>CHAPITRE PREMIER : MATERIEL ET METHODE</b> .....	57
I - Matériel.....	57
I.1.- Echantillonnage.....	57
I.1.1.- Récolte de l'échantillon.....	59
I.1.2.- Procédure d'échantillonnage.....	59
I.2.- Matériel de laboratoire.....	60
I.2.1.- Verrerie.....	60
I.2.2.- Réactifs.....	60
I.2.3.- Autres matériels.....	60
I.2.4.- Ensemble chromatographique.....	60

II - Méthode .....	61
II.1.- Extraction du chloramphenicol.....	61
II.2.- Mise au point des conditions chromatographiques pour les résultats.....	62
II.2.1.- Conditions opératoires.....	62
II.2.2.- Temps de rétention.....	64
II.2.3.- Courbe d'étalonnage .....	64
II.2.3.1.- Préparation des standards.....	64
II.2.3.2.- Injection des standards.....	66
II.2.3.3.- Résultats.....	66
II.2.4.- Rendement d'extraction.....	66
II.2.4.1.- Mode opératoire.....	66
II.2.4.2.- Résultats.....	69
II.2.5.- Validation de la méthode utilisée.....	70
 <b>CHAPITRE DEUXIEME : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>71</b>
I - Résultats .....	71
I.1.- Résultats qualitatifs.....	71
I.1.1.- Résultats chez les petits ruminants.....	71
I.1.2.- Résultats chez les bovins.....	75
I.2.- Résultats quantitatifs.....	75
 II - Discussions.....	75
II.1.- Discussion du Matériel.....	75
II.2.- Discussion de la Méthode.....	76
II.3.- Discussion des résultats.....	76
 <b>CONCLUSION.....</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXES</b>	

## INTRODUCTION

La Côte d'Ivoire, pays à tradition pastorale limitée, s'est lancée dans un processus de développement de l'élevage avec pour objectif d'atteindre l'autosuffisance en matière de protéines animales.

Face à la croissance exponentielle de la population, le rôle du Vétérinaire reste de produire en quantité et en qualité. Mais vu nos conditions climatiques favorables aux infections d'une part et dans le souci d'intensifier nos productions d'autre part, nos animaux sont exposés aux antibiotiques sous forme de médicaments ou d'additifs alimentaires.

L'utilisation de ces substances entraîne le risque de retrouver des résidus dans les denrées consommables, qui agissent directement sur la santé du consommateur. Vu l'importance du problème, le comité du Codex alimentarius en 1986, a établi des limites et des normes d'utilisation de certaines substances dans le but d'uniformiser les échanges internationaux.

La Côte d'Ivoire a pris conscience, très tôt, de la nécessité de suivre ce problème qui risque de porter préjudice à la santé du consommateur.

Dans le souci de cerner l'importance de ces problèmes de résidus, nous avons tenté d'adapter une méthode de dosage au contexte ivoirien et avons voulu commencer notre sondage avec l'un des plus ciblés : le chloramphenicol.

La première partie présente les caractères généraux du chloramphenicol. La seconde partie, quant à elle, s'intéresse aux méthodes de dosage des résidus d'antibiotique et enfin dans la troisième partie, une méthode de dosage par H.P.L.C. adaptée, est appliquée afin de détecter la présence de résidus de chloramphenicol dans la viande des ruminants domestiques.



# **PREMIERE PARTIE**

**ELLE COMPREND 2 CHAPITRES**

**1 - GENERALITES SUR LE CHLORAMPHENICOL**

**2 - PROBLEMES DE RESIDUS DE CHLORAMPHENICOL**

## CHAPITRE PREMIER : GENERALITES SUR LE CHLORAMPHENICOL

Le chloramphenicol est un antibiotique bactériostatique à large spectre d'action, de structure chimique simple. Il fut isolé en 1947, à partir de *Streptomyces venezuelae*, par les équipes de EHRLICH et BUKKHOLDER (9). Il fut utilisé en thérapeutique à partir de 1948.

### I - Classification - formule chimique

Le chloramphenicol était classé parmi les antibiotiques dérivés des acides aminés avec la viomycine et la cycloserine ; sa structure se rapprochant de celle de la tyrosine. Il fut considéré comme le chef de file de la famille des PHENICOLES.

Le chloramphenicol a pour formule brute :  $C_{11} H_{12} O_5 N_2 Cl_2$ . Il existe sous les deux formes erythro et threo ; l'isomère D(-) threo est le plus actif, donc utilisé en thérapeutique.

Sa formule développée (figure 1) est le D(-) threo paranitrophenyl 1 - dichloroacetamido - 2 - propane diol 1 - 3.

Le groupement nitro en position para et le fait qu'il soit un dérivé de l'acide dichloroacétique détermine la toxicité du produit.

La présence d'une fonction alcool primaire permet l'estérification par des acides gras supérieurs tels que les acides palmitique, stearique, succinique, etc...

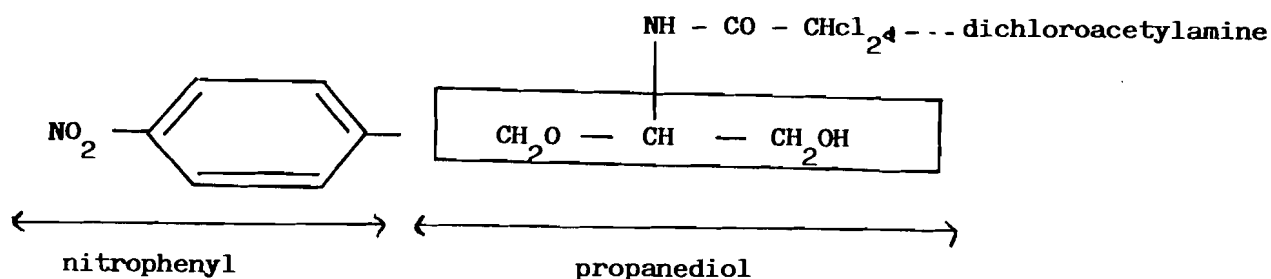


Fig. 1 : Formule plane développée du chloramphenicol

Le chloramphenicol est le premier antibiotique d'origine biologique dont la synthèse chimique a été réalisée en 1950 dans les laboratoires PARKE-DAVIS par l'équipe RELSTOCK, CONTROULIS (27).

## II - Propriétés Physico-chimiques

Le chloramphenicol se présente sous la forme de microcristaux blancs d'un goût très amer. C'est un alcool fortement lipophile. Il est stable à des températures élevées et aux pH neutre ou acide.

### II.1.- Propriétés physiques

#### II.1.1.- Les constantes physiques

Les principales constantes physiques sont énumérées dans le tableau 1 :

Masse moléculaire	323,14
Point de fusion	149°C à 153°C
Pouvoir rotatoire dans l'éthanol (5 g/100 ml)	à 20°C : + 20° à 25°C : + 18,5°
Spectre d'absorption	298 à 278 nm

Tableau 1 : Constantes physiques du C A P. - Source (36)

#### II.1.2.- Solubilité à la température ordinaire

Le chloramphenicol est très peu soluble dans l'eau (0,25 g % à 25°C), mais soluble dans les solvants organiques tels que le propylène glycol (15 g %). Sa solubilité dans certains solvants est reprise dans le tableau 2.

Eau	2,5 mg / ml
Propylène glycol	150,8 mg / ml
Ethanol	très importante
Acetate d'ethyle	très importante

Tableau 2 : Solubilité du CAP dans l'eau et différents solvants.  
Source (4)

### II.2.- Propriétés chimiques

Nous allons étudier quelques propriétés chimiques, parmi les plus importantes.

### II.2.1.- Stabilité

Le chloramphenicol est une molécule thermostable, résistante à l'ébullition, car demeure stable à 100°C pendant 5 heures. Ceci traduit la persistance des résidus même après un traitement culinaire. Il est aussi stable en milieu acide d'où son utilisation par la voie orale chez les animaux monogastriques. Chez les ruminants, il y a une perte d'activité par la voie orale à cause de l'activité nitroréductase de la flore ruminale.

Cette molécule est aussi stable en solution d'où une facilité d'utilisation.

### II.2.2.- Réaction d'identification

#### II.2.2.1.- Due au groupement nitré

Ce groupement peut être réduit en  $\text{NH}_2$  avec obtention d'une amine primaire aromatique suivie d'une diazotation permettant un dosage.

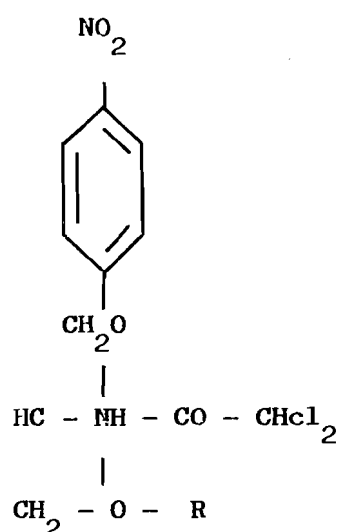
#### II.2.2.2.- Due à la présence du chlore

Le groupement dichloroacetamide peut libérer du chlore par précipitation avec du nitrate d'argent ( $\text{Ag NO}_3$ ). Le chlore organique ne précipite pas directement avec l' $\text{Ag NO}_3$ , pour cela, on le transforme en chlore minéralisé après ébullition avec de la potasse ( $\text{KOH}$  alcool). On obtient du chlorure de potassium ( $\text{KCl}$ ) sur lequel on fait agir l'argent. Ceci permet de doser le chloramphenicol.

### II.2.3.- Obtention des esters

Les esters sont obtenus par estérification de la fonction alcool primaire, à l'aide de Monoacides, permettant d'augmenter la liposolubilité, ce qui donnerait une durée d'action plus importante. Ce sont les composés à effet retard.

Avec les diacides (ex : hemisuccinate), on augmente l'hydrosolubilité, donc la rapidité d'action. Les principaux esters sont résumés dans le tableau 3.



R	ESTERS OBTENUS
$-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COON}_a$	Hemisuccinate (sel de sodium) Soluble dans l'eau
$-\text{OC}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$	PALMITOYL Poudre aromatisée ou sirop
$-\text{OC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3$	STEAROYL Suspension burable
$-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3$	STEAROYL-GLYCOLYL

Tableau 3 : Les esters du chloramphenicol  
Source (36)

### III - PHARMACOCINETIQUE

#### III.1.- Absorption

L'absorption se fait par la voie orale ou parentérale. Le chloramphenicol est rapidement absorbé par les muqueuses digestives, en prise orale, chez les monogastriques (90 %). Cette absorption est faite essentiellement par les vaisseaux chylifères. Tandis que chez les ruminants adultes, l'absorption serait nulle, car l'antibiotique serait détruit par les nitroréductases de la microflore du rumen. Ces Enzymes agiraient par la réduction du groupement nitré en groupement amine aromatique. LASERRE (16) montre l'absorption du chloramphenicol chez différentes espèces dans le tableau 4.

ESPECE	VOIE	DOSE UTILISEE	TEMPS	TAUX SERIQUE (mcg / ml)
Homme	per os	2 g	2 h	20 - 40
Cheval	per os	50 mg/kg	45 mn	50
	per os	15 mg/kg	60 mn	50
Chien	per os	75 mg/kg	4 h	40
Mouton	per os	50 mg/kg	-	0
	intra abomasale	50 mg/kg	2h	15

Tableau 4 : Absorption du chloramphenicol  
Source (16).

La résorption est rapide aussi par les voies intramusculaire et intraveineuse.

D'après PILLOUD (24), la demi-vie plasmatique du CAP est de 3,5 h chez les bovins après injection de 20 mg/kg, alors que VAN DER LEE (33) trouve des temps nettement plus courts chez les vaches laitières. Le tableau 5 montre les données plasmatiques après injection de CAP chez différentes espèces animales.

ESPECES	Concentrations plasmatiques au temps zéro (mg/l)	Demi-vie plasmatique (h)	volume de distribution (l/kg)
Chien	12,4	4,2	1,77
Chat	9,3	5,1	2,36
Porc	21,0	1,3	1,05
Chèvre	16,5	2,0	1,33
Poney	21,5	0,9	1,02

Tableau 5 : Données pharmacocinétiques après administration en IV de 22 mg/kg d'hémisuccinate de CAP.

Source (19).

### III.2.- Diffusion

Le chloramphenicol avec son caractère lipophile, est présent dans les liquides intra et extracellulaires. Cependant, cette diffusion est inégale car sa concentration dans le lymphé est supérieure à celle du sang ; ce qui explique son efficacité remarquable dans le traitement de la typhoïde.

Selon BRETON (5), on obtient des concentrations :

- supérieures aux concentrations plasmatiques dans l'urine, les reins, le foie, la rate, les poumons, le pancréas et le bile ;
- identiques dans les muscles ;
- inférieures dans la graisse, le cerveau, le liquide céphalorachidien et l'humeur aqueuse.

Contrairement à la plupart des antibiotiques, il diffuse bien dans le liquide céphalorachidien (30 à 50 % du taux sanguin), d'où son

utilisation dans les affections méningées. Il diffuse assez bien dans les cavités séreuses (plèvre, péricarde, synoviale) à 30-50 % du taux sérique, dans le sang placentaire et dans le lait.

### III.3.- Biotransformations

L'organisme inactive le chloramphenicol au niveau du foie principalement, par des réactions simples :

- Réactions de la Phase I :

• Réduction du NO<sub>2</sub>

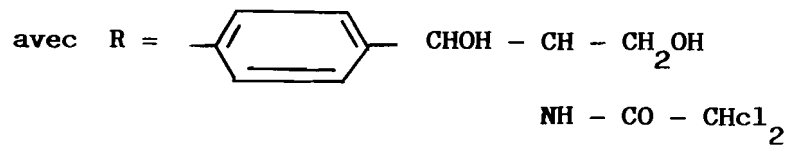
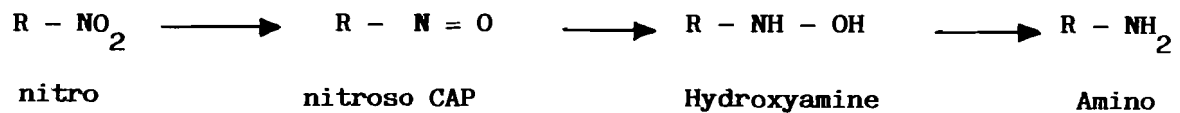


Fig. 2 : Réduction de la fonction NO<sub>2</sub> de chloramphenicol.

- Hydroxylation du cycle
- Acetylation du cycle
- Hydrolyse de la fonction dichloracetamide qui donne l'acide chloramphenicol oxamique qui est un métabolite majeur (25 %) et un substrat suicide du cytochrome P450. Il va créer des liaisons covalentes, qui auront pour effet, d'empêcher sa propre biotransformation et la biostransformation d'autres composés.

- Réactions de la Phase II

On a une glucuronoconjugaison au niveau de la fonction alcool.

Ceci amène MORRIS et coll., cité par MILHAUD (19), à proposer un exemple de biostransformation du CAP par les microsomes du foie de rat.

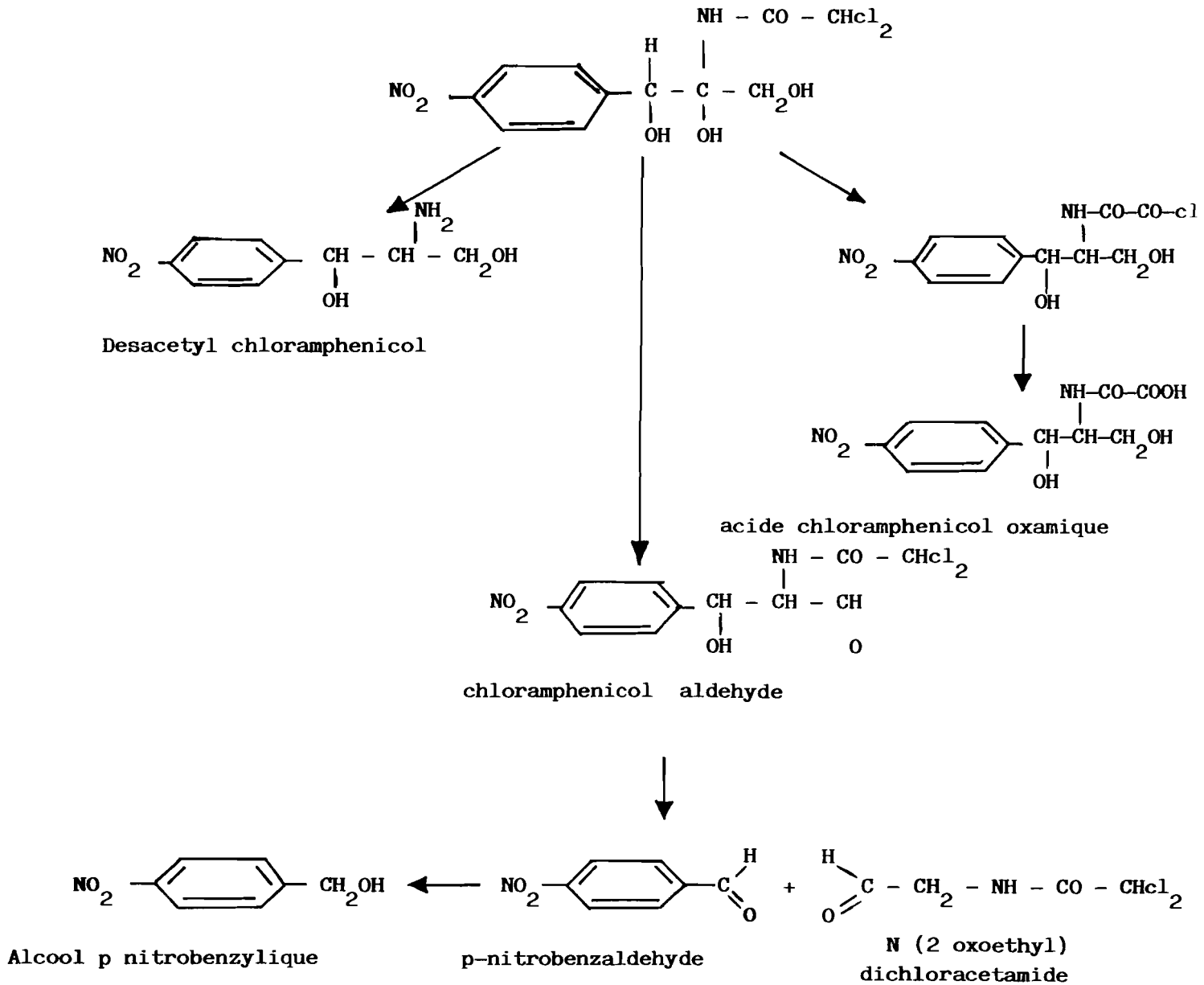
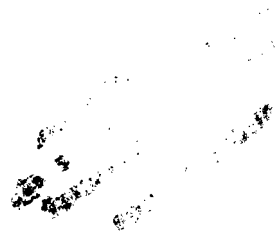


Figure 3 : Biotransformation du CAP par les Microsomes du foie de rat.

Source (19)



Les intermédiaires de réaction sont particulièrement réactifs et pourraient être responsables de la toxicité à long terme du chloramphenicol.

### **III.4.- Elimination**

L'élimination du chloramphenicol se fait essentiellement par la voie urinaire, accessoirement par le tube digestif, soit sous forme active ou sous forme de métabolites. Le métabolite principal est un glucuronide chez la plupart des espèces animales.

VAN DER LEE et col., (33) ont recherché le CAP et les métabolites dans l'urine, la bile, le foie, le rein et la viande de quatre bovins par H.P.L.C. Ils ont trouvé que, dans l'urine, la quantité de CAP libre = 0,6 à 5,5 ug/ml, est plus élevée que les métabolites (0,06 à 0,4 ug/ml pour le P nitrobenzaldehyde). Mais la teneur en glucuronoconjugués est 10 fois supérieure à celle du CAP libre. De même, GLASKO et coll. (12) ont montré chez l'homme que 10 % de la dose de CAP administré, était éliminé, inchangé dans l'urine alors que 80 % se trouvait sous forme de dérivés glucuronoconjugués. Les produits de dégradation inactifs sont sécrétés par les tubules renaux, tandis que la partie active non métabolisée, l'est par filtration glomerulaire.

Le chat ayant un déficit sur le plan glucuronoconjugaison, métabolise peu le CAP ; pour cela BRETON (5) propose d'augmenter l'intervalle entre les prises.

Le chloramphenicol s'élimine également par la bile, environ 3 p.100 selon LASERRE (16) et à moindre degré dans le liquide céphalorachidien et l'humeur aqueuse. Il existerait un cycle enterohépatique mis en évidence chez les bovins. L'élimination mammaire existe, mais elle est de courte durée.

## **IV - PROPRIETES ANTIBACTERIENNES**

### **IV.1.- Généralité sur les bactéries**

La bactérie est un être unicellulaire de taille variée (0,5  $\mu$  à 20  $\mu$ ), dont les principaux constituants sont :

- le Noyau : il est dépourvu de membrane, et réduit à un seul chromosome et porte l'information génétique indispensable à la vie de la bactérie.

- La membrane cytoplasmique : c'est la structure limitant le cytoplasme bactérien. Elle contient le cytoplasme et le sépare de la paroi. Elle est caractérisée par sa perméabilité sélective.

- Les plasmides : ce sont des fragments d'ADN bicaténaire extrachromosomal, autoreplicable et transmissible d'une bactérie à une autre.

Ils sont importants, car ils codent un ou plusieurs caractères dont la résistance bactérienne aux antibiotiques. La résistance ainsi transférée, peut devenir épidémique dans une flore bactérienne.

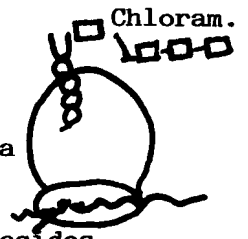
Des études récentes ont montré que ce sont les transposons qui sont des boucles d'ADN sur les plasmides ou "gènes sauteurs", qui peuvent transférer la résistance aux antibactériens.

- La paroi : enveloppe rigide la plus externe qui entoure et protège la bactérie, contre la forte pression osmotique extérieure. Elle confère à la bactérie. Son affinité tinctoriale et la sensibilité aux antibiotiques et aux bactériophages.

La bactérie est capable d'échanger des informations par le transfert de matériel génétique avec une autre bactérie réceptive de génotype différent, ce qui se traduit par l'apparition d'un individu nouveau. Il y a passage d'ADN d'une bactérie à une autre, soit par transformation, soit par conjugaison lors d'un contact étroit entre une bactérie donneuse et réceptrice. Le matériel transmis, peut être une fraction de chromosome ou de plasmide. Enfin, l'échange peut se faire par l'intermédiaire d'un bactériophage ; c'est la transduction.

#### **IV.2.- Mode d'action**

Le chloramphénicol bactériostatique, agit au niveau de la synthèse protéique, au niveau de la sous-unité 50 S des ribosomes (voir tableau 6).

Localisation	Antitiogiques	Spectre	Mécanisme
Paroi	Pénicilline . G, M . A	CG + G+ , G-	Inhibition des muco-peptides de la paroi
	Céphalosporines		
	Bacitracine Vancomycine, Risto.	G+ R - BK	
Membrane cytoplasmique	Polymyxine Colistine	BG-	Modification perméabilité
Cytoplasme Ribosomes	Genta, Tobra Strepto, Kana	G+, G- G+, G-, BK	 Chloram. Tétra aminosides
	Chloramphenicol	G+, G-	
	Erythromycine - Spira, Oléando	BG+	
ADN	Ac. nalidixique	BG-	Blocage DNA
ARN	Rifampicine	BG-, BK	Blocage RNA polymérase

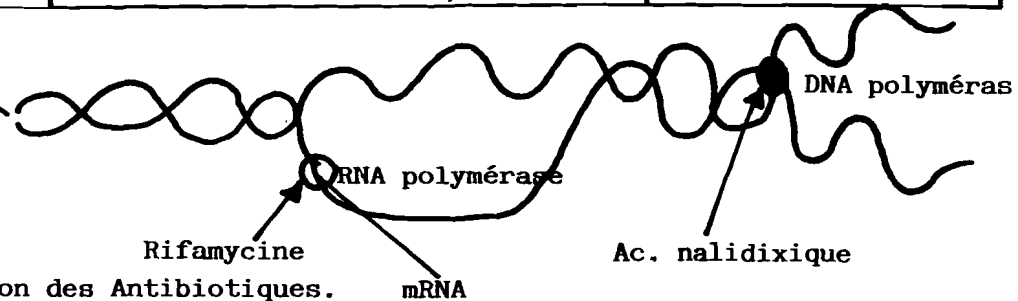


Table au 6 : Mécanisme d'action des Antibiotiques.

Il s'oppose à la fixation de l'ARN messager et empêche au niveau ribosomal, le fonctionnement du complexe :  
Amino-Acyl-ARNt + ribosome + ARN messager (4). Divers processus cependant, ont été évoqués :

- empêcher l'accolement des ARNt sur le ribosome ;
- empêcher l'allongement du peptide par inhibition d'une enzyme formant les liaisons peptidiques ;
- inhibition d'une transferase en déplaçant le peptide du site "donneur" au site "accepteur".

Avec ces processus, le chloramphenicol entraîne une inhibition de la multiplication bactérienne. Par contre, la bactérie reste parfaitement viable, car c'est un effet bactériostatique uniquement.

L'activité antibactérienne est grossièrement proportionnelle à l'électronégativité du substituant para. En dehors des bactéries, l'action d'inhibition des synthèses protéiques s'exerce dans l'organisme animal ou humain sur les cellules immatures en prolifération active (cellules sanguines médullaires).

#### IV.3.- Spectre d'action

Le spectre d'action est large et l'action est plus intense pour les bactéries Gram-négatifs, il est actif aussi contre les gram-positifs, rickettsies, Mycoplasmes et chlamidés. Il est dénué de toute activité vis-à-vis des Mycobatéries.

Son action contre Salmonella est la plus intéressante, car il passe directement dans la lymphe ; d'où son utilisation en Médecine humaine dans la fièvre typhoïde. Le pH optimum d'activité est très large, et varie entre 2 et 9. C'est le seul antibiotique dont l'activité antibactérienne se déploie sur une gamme aussi large de pH.

La concentration minimum inhibitrice (C.M.I.) in vitro, est en moyenne de 1 à 10 µg/ml pour la majorité des germes sensibles (21).

LASSERE (16) et NEUMAN (21) ont étudié la sensibilité des différentes bactéries in vitro, mais aussi d'après les résultats obtenus in vivo (tableau 7).

#### IV.4.- Résistance bactérienne

Avec un spectre d'activité aussi large, le chloramphenicol a été beaucoup utilisé en médecine humaine comme en médecine vétérinaire ; ceci pose le problème de bactéries antibiorésistantes. Il existe deux mécanismes différents de résistance antibactérien ; chromosomique et extrachromosomique.

- La résistance chromosomique est lente dans son développement et d'un intérêt limité en clinique (14). Elle se manifeste par des modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui la rend imperméable au chloramphenicol.

- La résistance extrachromosomique ou plasmidique est d'une importance plus grande, car elle est transférable d'une bactérie à une autre. Il peut aussi avoir transfert de facteurs de résistance simple ou multiples rencontré chez les bactéries pathogènes et non pathogènes (11). Elle se manifeste par l'inactivation du chloramphenicol par une réaction d'acétylation, grâce à une acétyltransférase, synthétisée par les gènes plasmidiques de résistance. La résistance multiple a été démontrée en isolant des facteurs plasmidiques "R" à partir de bactéries telles que *Salmonella*, *Haemophilus* et *Escherichia coli*, en provenance de patients humains et d'animaux.

GERMES	Activité du chloramphenicol in vitro
* Cocci Gram <sup>+</sup> - staphylocoques - Enterocoques	++ ++
* Cocci Gram <sup>-</sup> - Meningocoques - Gonocoques	+++
* Bacilles Gram <sup>+</sup> - C. diphtheria - B anthracis - Listeria	± ± ++
* Bacilles Gram <sup>-</sup> - Coliformes - Klebsiella - Aerobacter - Enterobacter - Serratia - Proteus mirabilis - Pseudomonas aeruginosa - Haemophilus - Salmonella - Shigella - Pasteurella	++ ++ ++ ± (-) + + ++ +++ ++ ++
* Mycobacteries	(-)
* Treponemes, Leptospires	++
* Ricktsies	+++
* Mycoplasmes	++
* Chlamydia	++
* Plasmodium	-
* Toxoplasmes	(-)

Tableau 7 : Spectre bactériologique du CAP "in vitro". Source (21).

Légende :    - inactif                    ++ actif  
                  + peu actif                    +++ très actif

La même plasmide peut contenir plusieurs gènes qui contrôlent des actions enzymatiques multiples tels que acetyl-transferase et B lactamase (11).

La résistance bactérienne est très importante à étudier tant et si bien que la recherche s'effectue sur tous les antibiotiques ensemble, et surtout leur application. Nous observons souvent des incompatibilités d'utilisation et des erreurs thérapeutiques.

Il faut aussi savoir que la résistance au chloramphenicol peut, par le transfert plasmidique de résistance multiple, résulter de l'utilisation d'autres antibiotiques.

## **V - TOXICITE ET EFFETS SECONDAIRES**

La toxicité aigüe du chloramphenicol, à l'exception des animaux nouveaux-nés, est très réduite. La DL50 chez la souris est de 200 mg/kg par voie intraveineuse, de 320 mg/kg par voie parentale, de 1500-2500 mg/kg par voie orale (21).

Mais des accidents peuvent survenir à des doses thérapeutiques :

### **V.1.- Accidents sanguins**

Il en existe deux :

- Accidents précoces, réversibles appelés Syndrome anémique réversible caractérisé par une cytopénie accusée intéressant principalement la lignée des globules rouges avec des interactions sur les autres lignées cellulaires entraînant une agranulocytose. Les globules rouges contiennent moins de fer. Il y a vacuolisation des proerythroblastes (29) avec une augmentation du fer sérique et parfois, on observe une leucopénie et une thrombopénie.

Ce syndrome réversible est lié à l'inhibition de la synthèse protéique en agissant sur le cytochrome P450 dans le système mitochondrial.

On retrouve ces accidents chez l'homme et chez l'animal, surtout le chat qui n'a pas la possibilité de faire la glucuroconjugaison, avec une quantité importante du chloramphenicol (18).

- Accidents tardifs, irréversibles, sans rapport avec la dose. On observe une pancytopenie grave et souvent mortelle, liée à une hypoplasie ou une aplasie des lignées cellulaires de la moëlle osseuse (baisse rapide ou disparition complète des cellules souches produisant les lignées cellulaires sanguines dans la moëlle).

La survie est très rare lorsque cette anémie aplasique est d'apparition supérieure à deux mois. Elle se rencontre uniquement chez l'homme, comme une atteinte spontanée non liée à la dose de chloramphenicol reçue. Le risque d'anémie aplasique a été évalué par des enquêtes épidémiologiques à 1/20.000 à 1/40.000 traitements identifiés par VINCENT (34). En outre, il signale une relation avec la capacité génétique de certains individus à produire du nitrosochloramphenicol par transformation enzymatique du noyau nitrobenzène présent dans le chloramphenicol. Ce même nitrosochloramphenicol a été reconnu capable d'induire l'anémie aplasique, par la voie intraveineuse chez le veau, à des dosages de 1 à 2 % plus élevés que la quantité de chloramphenicol nécessaire (11).

Cette aplasie médullaire est due à une inhibition de la synthèse de l'ADN par le nitrosochloramphenicol (qui se comporte comme un agent alkylant), et le p-nitrobenzaldehyde ; et cela irréversiblement.

En outre, il faut signaler que certains cas de sensibilité raciale ont été observés sur les populations de race noire.

La sensibilité familiale aux troubles de dyscrasie sanguine ont été également observés chez les parents de patients atteints par la maladie (3).

Cet accident, plutôt rare, est interprété comme une sensibilité individuelle, une idiosyncrasie.



## V.2.- Accidents par immaturation métabolique

L'immaturation des systèmes enzymatiques du foie et du rein chez le nouveau-né, a pour conséquence, un déficit du processus de détoxification du chloramphenicol par conjugaison glucuronique au niveau du foie, ainsi qu'une élimination rénale plus faible.

Ceci se traduit par des accidents graves, entraînant une forte mortalité après un syndrome de cyanose grisâtre dit "syndrome cendré" observé chez les nouveaux-nés et les prématurés traités au chloramphenicol.

Il y a en outre, des troubles digestifs et un collapsus circulatoire mortel.

Le chloramphenicol est donc à proscrire chez les prématurés, les nouveaux-nés ainsi que dans la dernière période de grossesse.

## V.3.- Accidents nerveux

On peut observer des vertiges, des convulsions et surtout des troubles psychiques : délire, confusion mentale, hallucination, psychoses, accentuation de l'encéphalite existante.

## V.4.- Accidents au niveau de la peau et des muqueuses

Ils s'observent surtout chez les femmes enceintes, les dénutris et les sujets traités en plus avec des dérives corticoïques ou des cytostatiques.

On a des glossites, stomatites, œsophagite, vulvovaginite... dues d'une part à la présence d'un champignon : *Oïdium albicans*, et d'autre part à l'absence d'antagonisme microbien (car le chloramphenicol détruit toute la flore) puis accessoirement à une hypovitaminose B.

## V.5.- Autres effets secondaires

Les autres effets secondaires sont variés comme :

- Des symptômes d'intolérance digestive avec anorexie, nausées, douleurs abdominales, vomissements, diarrhée, brûlure anale lors d'administration à des doses supérieures à 2 g/jour.

- Des troubles du Métabolisme musculaire, qui sont rares, avec parésie de l'accomodation (muscle ciliaire) et asthenie musculaire.

- Des phénomènes de sensibilisation allergique.

- Une action immunosuppressive, par son effet d'inhibition de l'ARN messenger des cellules sanguines.

- Une inhibition de la synthèse protéique dans les cellules animales.

## **VI - UTILISATION DU CHLORAMPHENICOL**

### **VI.1.- Forme d'utilisation (36)**

Le chloramphenicol peut se présenter sous trois formes :

- la forme dragée : pour la voie orale ;
- les solutions préparées à des concentrations définies par le fabricant pour les voies orale et parentale ;
- les poudres à dissoudre dans un solvant et à préparation extemporannée pour la voie parentale.

### **VI.2.- Voie d'administration**

Le tableau 8 montre les différentes voies d'administration du chloramphenicol. Quelle que soit la voie utilisée, le traitement ne sera pas prolongé au delà de 2 semaines.

#### **VI.2.1.- Voie orale**

Elle est la plus favorable pour les dragées ou les capsules. Le chloramphenicol y étant résorbé à 80-90 %. Mais cette voie ne doit pas être utilisée chez les ruminants en raison de son effet nocif sur la flore et de son inactivation.

### VI.2.2.- Voie parentale

Elle est utile dans les infections sévères. Ce sont les esters qui sont les plus utilisés, surtout par les voie intraveineuse ou intramusculaire et sous-cutanée.

### VI.2.3.- La balnéation

C'est la voie utilisée en pisciculture. Le produit employé doit être soluble et facilement résorbable. Cette voie est réservée aux traitements des infections superficielles (Bactérioses cutanées).

Le tableau 8 résume tout ce qui est dit ci-dessus.

Principes actifs	Noms déposés (N.D.)	Voie d'administration
chloramphenicol	- CHLORAMPHENICOL	per os
	- TIFOMYCINE	per os, IM, bain
	- SINTOMICETINE	per os
	- CHLORMYCETINE	per os
Hemisuccinate de chloramphenicol	- SOLNICOL	SC, IM, IV

Tableau 8 : Voies d'administration du chloramphenicol  
Source (36).

En médecine humaine, le chloramphenicol peut être utilisé par d'autres voies, notamment la voie rectale (sous forme de suppositoires) en cas d'intolérance digestive. Localement, on peut utiliser des pommades dermatologiques, des solutions ophtalmiques, otologiques et enfin, on peut l'utiliser sous forme d'ovules gynécologiques (à déconseiller).

### VI.3.- Utilisations thérapeutiques

Lorsqu'une maladie infectieuse apparaît dans un effectif, on utilise un antibiotique à large spectre dans un premier temps, pour limiter les pertes. Le chloramphenicol est beaucoup utilisé en médecine. Nous

résumons dans le tableau 9, quelques affections traitées avec le chloramphenicol.

Espèces	Posologie	Affections
Homme	• per os 2-4 g / J	Typhoïde, Brucellose, Meningite, Pneumonie atypique, Salmonellose, Ricktsioses.
Bovins	• Parentale 15-50 mg/kg 2 fois/j • Voie galactophore 100 - 300 mg/quartier	Colibacillose, Salmonellose pasteurellose Mammite
Ovins	• Parentale 50 mg 2 fois / J	Diarrhées
Porcs	• Per os 40-50 mg/kg/j (en 2 prises) • Parentale 30-50 mg/kg toutes les 6 h	Colibacillose, Salmonellose, Pasteurellose, pneumonie virale, coryza rhinite atrophique Mammites
Equides	• Parentale 20-35 mg/kg Toutes les 4 h	Polyarthrites à Salmonelles
Volailles	* Poussins : eau de boisson à 1 p.1000 * Poules : aliments à 2,2 p.1000	Pullorose, typhose, pasteurellose, coryza, Maladie respiratoire chronique (M.R.C.)
Poissons	• Bain : 20 mg/l • Orale : 50-80 mg/kg	Furonculoses de la truite, affection à <i>Aeromonas hydrophila</i> et à <i>Vibrio</i>

Tableau 9 : Affections utilisant du chloramphenicol et leur posologie.  
Source (36) (21)

#### VI.4.- Autres utilisations

Le chloramphenicol est utilisé en zootechnie pour obtenir des veaux blancs, du fait de son action aplasante. Avec sa thermostabilité, il résisterait à la cuisson d'où ce qui fait qu'il y a un très grand risque lors de la présence de résidus dans les viandes. Nous pensons que ce genre de procédé est à proscrire, car les inconvénients sont plus importants que les avantages.

De même, le chloramphenicol doit être interdit en raison de sa toxicité importante, dans l'alimentation animale. En effet, certains

éleveurs l'utilisent pour l'antibiosupplémentation (2 à 100 ppm) ; ceci permettrait d'accroître le développement des masses musculaires.

Pour la conservation des denrées, le chloramphenicol est peu utilisé car il est moins actif que d'autres antibiotiques comme les tétracyclines. Mais les travaux de GOLBERG cités par BINET (4) attribuent une efficacité au chloramphenicol pour la conservation de viande de boeuf hachée, aux concentrations de 2 ; 1,5 ; 1 et 0,5 ppm. Il prolongerait de 9 jours, la conservation de cette viande.

#### **VI.5.- Les associations avec d'autres médicaments**

Il a été signalé par RUCKEBUSH (28) des incompatibilités physico-chimiques du chloramphenicol avec d'autres antibiotiques tels que l'ampicilline, les tetracyclines, les macrolides, la polymyxine, la gentamycine, les sulfamides ; les corticoïdes et les vitamines des groupes B et C.

Tandis que NEUMAN (21) pense que le chloramphenicol peut être utile avec les penicillines dans les Meningites à haemophilus (association apparemment paradoxale selon le schéma classique), la streptomycine, les sulfamides, les tetracyclines et le polymyxine (surtout dans les infections graves septicémiques) ; et enfin avec les vitamines B et C ; la nystatine. Mais il faut éviter des cures prolongées ou répétées qui prédisposent aux accidents sanguins. NEUMAN sait qu'il y a des risques, mais lorsqu'on est en face d'une infection grave, on peut utiliser ces produits en association avec le chloramphenicol.

En règle général, selon NEUMAN, il faut éviter l'association du chloramphenicol avec des Médicaments leucopeniants : sulfamides, sels d'or... ; avec les barbituriques inducteurs enzymatiques (accélérant l'inactivation enzymatique du chloramphenicol). Celui-ci à son tour inhibe la biotransformation métabolique des barbituriques et peut ainsi potentialiser leur effet hypnotique ou toxique ; avec les anticoagulants oraux ; les synergistines (antagonisme par compétition sur les mêmes sites 50S du ribosome bactérien), les penicillines et les cephalosporines en général antagonistes, sauf pour les straphylocoques sécréteurs de bêta-Lactamases et l'haemophilus influenzae.

La figure 4 nous montre les associations possibles avec les autres antibiotiques.

Du fait de l'action immunosuppressive du chloramphenicol, une administration prolongée de corticoïdes pourrait avoir des conséquences graves.

En résumé de ces généralités, nous pouvons dire que le chloramphenicol est un antibiotique bactériostatique à caractère lipophile, diffusant bien dans les différents tissus et dans les vaisseaux chylifères d'où son utilisation contre les salmonelles lors de fièvre typhoïde.

Il a un mécanisme d'action simple, mais efficace, car il inhibe la synthèse protéique des bactéries au niveau des ribosomes. Il a en outre, un large spectre d'action dans la majorité des maladies enzootiques dues aux bactéries G<sup>+</sup> et G<sup>-</sup>.

C'est un antibiotique qui avait une grande valeur en médecine vétérinaire. Son utilisation chez les animaux est remise en cause avec les problèmes de résidus.

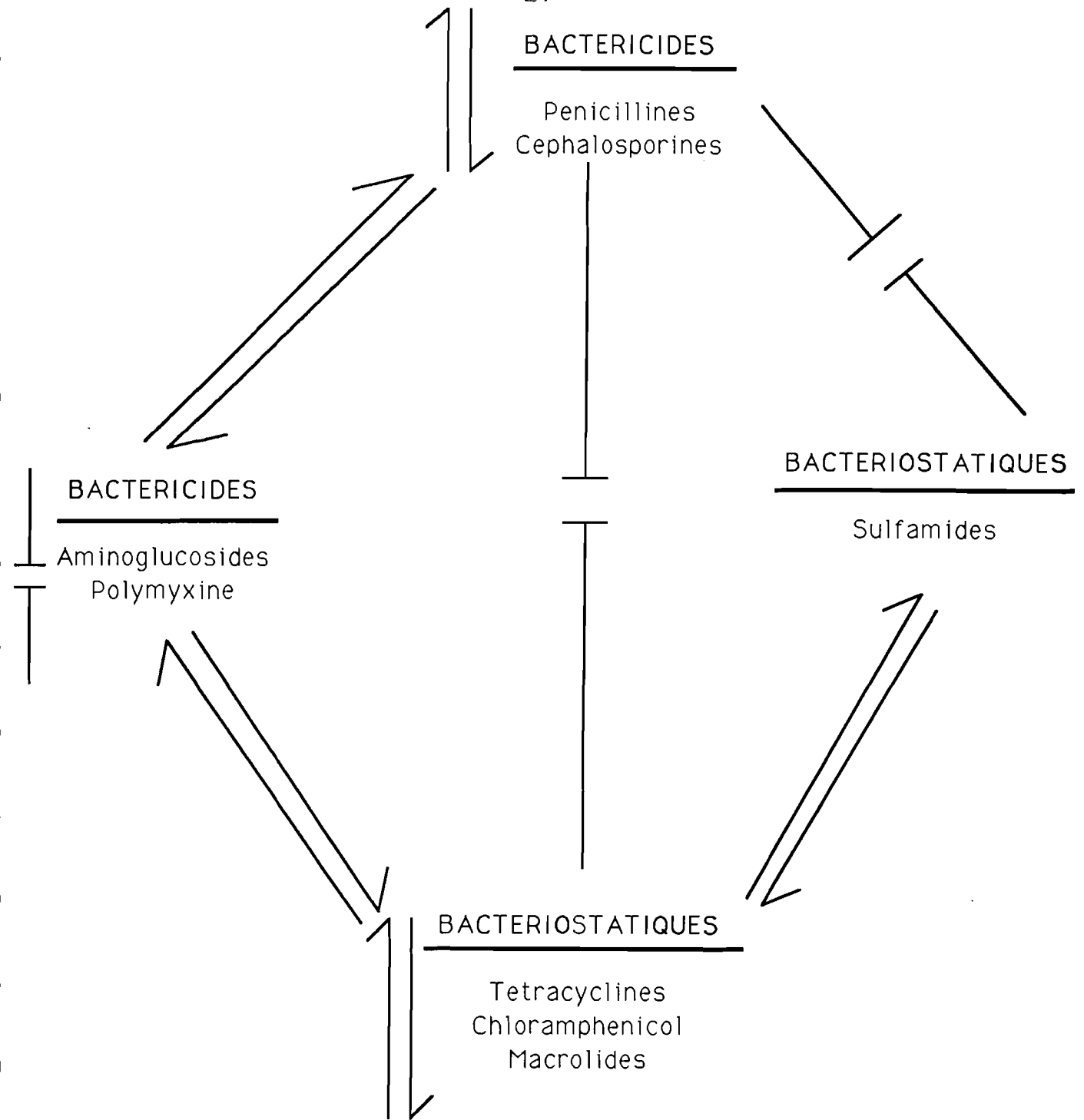
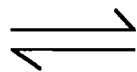


Figure 4 : Règles Générales de la combinaison des Antibiotiques. Source (26)

Légende :



Possibilité de combiner



Combinaison contre indiquée

## CHAPITRE DEUXIEME : PROBLEMES DES RESIDUS DE CHLORAMPHENICOL

Les causes de la présence de résidus de chloramphenicol dans les denrées alimentaires d'origine animale sont de trois ordres :

- le traitement des animaux peu avant l'abattage ;
- l'utilisation quasi systématique d'aliments antibiotosupplémentés dans les élevages avec le non respect du délai d'attente ;
- l'abattage d'urgence des animaux pour maladie ou accident.

Certains auteurs comme GOUNELLE (13), pensent que certaines substances ont des effets cumulatifs, de sorte que même l'absorption de petites quantités peut à la longue provoquer des troubles.

### I.- Présence de résidus de chloramphenicol dans les denrées

Sur un échantillonnage de viandes prélevées en boucherie parisienne, des résidus d'antibiotiques en général, étaient présents dans 26 % des échantillons de Porc, 20 % des échantillons de boeuf et 15 % des échantillons de veau selon Frère cité par BINET (4) en 1969.

Nous envisagerons la présence de résidus dans la viande et des abats, ainsi que le lait et les oeufs.

#### I.1.- Viande et abats

##### I.1.1.- Bovins

NOUWS et ZIV (22) ont administré de 10 à 40 mg/kg de chloramphenicol à des bovins par voie IM. Les résidus mesurés par colorimétrie avec 40 mg/kg sont dans le muscle de 3,6 ppm au bout de 46 h, et de 0,73 ppm au bout de 65 h avec une demi-vie de 13,8 h. Dans le rein et le foie, ils sont de l'ordre de 20 ppm après 46 h et de 10 ppm après 65 h, avec une demi-vie de l'ordre de 20 h. Les quantités retrouvées au point d'injection sont importantes :  $48,6 \pm 9,1$  % de la dose administrée après 7h 3/4 et  $25,2 \pm 6$  % après 18 h.



Les auteurs ont calculé qu'il faudrait attendre 7 à 10 jours pour que les résidus soient de 2 ppb dans le muscle et le cortex renal.

De même VAN DER LEE et coll( 33), 18h 1/2 après avoir administré environ 10 mg/kg de chloramphenicol par voie IV ou intramammaire, ne retrouvent pratiquement pas de résidus dans la viande, le foie et le rein (chloramphenicol < 0,05 ppm ; acide p. introbenzoïque de l'ordre de 0,05 ppm pour une vache, < 0,01 ppm pour les trois autres métabolites).

### I.1.2.- Porcins

La viande de porc est très consommée en Côte d'Ivoire, pour cela nous pensons qu'il est important de connaître le taux de résidus dans les différents éléments comestibles.

Une étude réalisée par ENGLISH et SEAWRIGHT (tableau 10) cité par BINET (4), montre les résidus de CAP chez le Porc après une administration d'une dose de 50 mg/kg. Les échantillons ont été prélevés 6h après l'administration.

On peut constater que les taux les plus importants ont été trouvés dans les muscles et le rein, tandis que les quantités sont très faibles dans le foie, car le CAP est éliminé en grande partie par la bile chez le Porc.

### I.1.3.- Poulets de chair

SISODIA et DUNLOP (30) ont abreuvé pendant cinq jours des poulets de chair âgés de 7 semaines avec de l'eau contenant 40 ppm de chloramphenicol. L'abattage immédiat révèle par colorimétrie des résidus supérieurs à 0,5 ppm dans le rein, et de l'ordre de 0,2 ppm dans le muscle, le foie et la peau plus la graisse. Au bout de 24h, les résultats sont inférieurs à la sensibilité de la méthode (0,1 ppm) dans tous les tissus, sauf dans le rein où l'on trouve encore 0,28 ppm après 72 heures.

VOIE	Nombre de Porc	Taux en mcg/ml		Taux en mcg/g									
		Urine	Bile	Muscle	Coeur	Rein	Foie	Peau	Rate	Cerveau	Testicule	Poumon	Paroi estomac
IM	4	4,2	3,1	3,3	6,2	1,8	1,1	1,2	1,6	1,5	-	2,3	0,6
IM	10	27,5	3,2	1,5	3,3	4,6	0	-	3,6	1,6	2,4	1,6	2,7
Orale	7	14,7	4,5	3,3	0,6	1,2	0	0	0,8	2,4	-	0,5	0,8
Orale	9	-	-	3,5	2,8	10,0	1,4	0,7	3,7	2,7	4,2	3,6	8,6
IP	5	27,3	0,65	0	0	1,3	0	-	0	1,6	-	0	0
IP	6	6,0	0,65	0,8	1,1	0,8	1,1	0	1,6	1,7	2,0	0,6	1,2

Tableau 10 : Résidus en mcg/g et en mcg/ml de chloramphenicol trouvés chez le porc. Source (4).

#### I.1.4.- Poissons

LASSERE (16) retrouve dans le muscle de la truite d'élevage, 5 ppm, 48h après l'administration d'une dose orale de 100 mg/kg avec une méthode colorimétrique. Il trouve 1,4 ppm au bout de 96h. Après un bain de 48h dans de l'eau contenant 100 ppm de CAP, la teneur dans le muscle est de 1 ppm.

L'importance est moindre au niveau des viscères, car elles ne sont pas consommées dans nos pays. Il préconise un délai d'attente minimum de 4 j avant la commercialisation du poisson.

#### I.2.- Oeufs

SISODIA et DUNLOP (31) ont abreuvé 36 poules pondeuses avec de l'eau contenant 40 ppm de CAP pendant cinq jours.

Dans le jaune, les concentrations ont augmenté progressivement à partir de 3e jour, pour atteindre un maximum le 6e jour (1<sup>er</sup> jour de l'arrêt du traitement) avec 0,32 ppm et ont décru lentement (0,14 ppm le 10<sup>ème</sup> jour). L'albumine s'enrichit plus vite en CAP (Max 0,17 ppm le 4e j) et présente une décroissance plus rapide (< 0,1 ppm : 4 jours après la fin du traitement).

La contamination des oeufs n'est pas très élevée (Max 0,3 ppm), mais elle se manifeste pendant une dizaine de jours.

#### I.3.- Lait

ZIV et coll (37) injectent 500 mg de CAP par la voie intramammaire. A la suite d'administration unique ou de deux administrations à 24 h d'intervalle, ils observent des teneurs très élevées à la première traite (40 à 300 ppm), mais diminuant rapidement.

Après administration du CAP par voie intramusculaire, le chloramphenicol diffuse dans la mamelle passivement. Si l'administration dure trois jours consécutivement avec une dose de 50

mg/kg de CAP, les contaminations dans le lait se situent entre 1 et 3 ppm.

WALL et coll (35) après avoir administré 600 mg de CAP dans le propylène glycol à des chèvres par voie IM, retrouvent des concentrations de l'ordre de 3 ppm au bout de 2 h. En intramammaire, les concentrations s'élèvent à 285 ppm au bout d'une heure.

Au bout de 32 h, les résidus sont non détectables (< 5 ppb) dans les deux cas.

Au total, nous pouvons dire que le lait est l'aliment le plus incriminé, car c'est un produit de consommation courante. Il est utilisé pour l'alimentation des nouveaux-nés ; il doit donc être d'une quantité exceptionnelle.

Dans le contexte africain, il ne faut pas oublier l'oeuf qui est beaucoup utilisé à cause du déficit protéique constaté dans certaines régions notamment pour les enfants en bas âge.

## **II - Conséquences de la présence de résidus de chloramphenicol dans les denrées alimentaires**

Les résidus contenus dans les denrées alimentaires d'origine animale peuvent être à la base de certains inconvénients tels que la fragilisation de la moëlle osseuse et du système réticuloendothelial. Nous résumons ici une partie des problèmes rencontrés à cause des résidus.

### **II.1.- Toxicité directe**

Du fait de sa toxicité importante, le chloramphenicol reste dangereux surtout pour les sujets fragiles comme les nouveaux-nés.

ADAMESTEANU et coll. cité par NEUMAN (21) ont montré que le chloramphenicol administré dans le colostrum, provoque des lésions importantes du rein en entraînant une protéinurie et une oligurie. Les lésions affectent la totalité du néphron avec une dégénérescence associée à une réaction interstitielle.

Chez les humains, LACOMME cité par NEUMAN (21) remarque une augmentation des ictères graves chez les nouveaux-nés. Il pense que le chloramphenicol peut jouer un rôle en entrant en compétition avec la bilirubine, tous deux éliminés par glucuroconjugaison.

## **II.2.- Fréquence accrue du développement des champignons pathogènes**

La prise d'un antibiotique par la voie orale, modifie la flore du tube digestif, même s'il est pris en quantité minime.

Il a été observé une recrudescence des candidoses depuis l'utilisation des antibiotiques.

Les Métabolites du CAP tels que le dihydro CAP (DH - CAP) et le nitrophenyl-2-amino-3 hydroxypropanone (NPAP) pouvant être produits par la flore intestinale, sont plus toxiques que le CAP lui-même. Ces métabolites seraient capables d'inhiber la croissance cellulaire, la synthèse de protéine mitochondriale, la synthèse d'ADN et endommageraient le seul brin d'ADN capable de produire les lymphocytes et les cellules de la Moëlle osseuse (6). Ceci diminuerait considérablement les moyens de défense de l'organisme lors d'invasion de champignons ou de protozoaires.

## **II.3.- Sélection de souches microbiennes résistantes**

C'est un fait que nous trouvons important, car si un individu ingère de la viande contenant des résidus de chloramphenicol pendant plusieurs jours ; il est certain que la flore va considérablement varier. Il ne restera que les souches ayant pu développer une certaine résistance, chose facile avec ces petites doses de chloramphenicol.

Des études citées par BINET (4) ont montré qu'il existe des souches d'*Escherichia coli* résistantes, des staphylocoques et des entérobactéries. Il n'a pas encore été trouvé de résistance au chloramphenicol sur des bactéries anaérobies obligées telles que Bactéroïdes, Fusobactérium, Peptostreptococcus d'origine animale. Mais beaucoup d'entre elles portent des facteurs de résistance à la

pénicilline, à la cephalotine et à la tétracycline (15). Il faut remarquer que ce sont les Salmonelles et Haemophilus qui sont les germes les plus étudiés. Par ailleurs, des études épidémiologiques faites par CHERUBIN et coll. cité par (11), traitant de la situation aux Etats-Unis et en Angleterre, ont démontré que, même à la période la plus critique où l'on isolait des Salmonelles résistantes des patients humains, 2,1 % seulement de ces Salmonelles étaient identiques aux souches bovines. La relation directe entre les Salmonelles d'origine humaine et animale apparaît par conséquent assez problématique, en tout cas par les problèmes de résistance.

En résumé de ce chapitre, nous pouvons dire que le problème de résidus est important car les animaux traités et abattus d'urgence sans le respect du délai d'attente, constituent un réel danger pour les consommateurs. Le Syndrome aplasique est le danger le plus grand. La gravité de cette affection (toujours mortelle) a conduit le codex alimentarius à envisager l'interdiction de l'utilisation du chloramphenicol en médecine vétérinaire. En attendant, des mesures doivent être prises surtout chez les vaches laitières et les poules pondeuses. Pour les poulets de chair, il faut choisir un autre antibiotique moins toxique. Il faut enfin expliquer aux éleveurs, l'intérêt qu'ils ont, à respecter le délai d'attente car pour nous, la santé humaine n'a pas de prix.

Ensuite, il faudrait contrôler la vente, l'utilisation du chloramphenicol au niveau des dépôts ou pharmacies et des fermes. Enfin, il faut nécessairement faire des contrôles au niveau des abattoirs pour évaluer quantitativement la présence de résidus du CAP dans les denrées.

## **DEUXIEME PARTIE**

### **METHODE DE RECHERCHE DES RESIDUS**

Cette partie comprend 2 chapitres :

- 1 - Les critères de choix d'une méthode
- 2 - Les différentes techniques utilisables

## CHAPITRE PREMIER : LES CRITERES DE CHOIX D'UNE METHODE

La méthode de recherche des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale adaptée à nos conditions, reste une préoccupation majeure.

Il est indispensable de rappeler les principes permettant de faire un bon choix et définis par RICHOUBAL et CUMONT, cité par DENIER (8).

### I - Les qualités d'une méthode d'analyse

#### I.1.- La précision ("accuracy")

Elle est définie comme la différence entre la valeur mesurée par la méthode et la valeur vraie de la grandeur à mesurer. Elle est évaluée par :

- la fidélité qui est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé à plusieurs reprises dans des conditions déterminées ;

- la répétabilité : ce sont les résultats obtenus par le même opérateur (même laboratoire, mêmes équipements) ;

- la reproductibilité : résultats identiques obtenus dans des conditions différentes.

Les estimations sont faites à partir de modèles mathématiques ou statistiques ;

- la justesse : étroitesse de l'accord entre la vraie valeur et le résultat moyen obtenu en appliquant le procédé expérimental, un grand nombre de fois. Elle dépend de :

- + l'exactitude du calibrage ou d'étalonnage (accord entre la droite observée et la droite théorique d'étalonnage) ;

- + la précision d'estimation qui est l'étroitesse de l'accord entre une méthode dite de référence et une méthode de routine sur un matériel identique.



### **1.2.- La sensibilité ("sensitivity")**

C'est le rapport de l'accroissement de la grandeur observée sur celui correspondant à la grandeur à mesurer au voisinage d'une valeur donnée. Elle est souvent confondue à tort avec la limite de détection de la méthode.

### **1.3.- Le spécificité ("specificity")**

C'est la possibilité pour une méthode de répondre exclusivement à la substance recherchée : une méthode spécifique s'oppose à une méthode polyvalente ou méthode "multirésidus".

### **1.4.- La détectabilité ou limite de détection**

C'est la plus faible valeur de la grandeur à mesurer qui puisse être effectivement détectée et mesurée, distincte du bruit de fond. Elle doit être reproductible. Il faut travailler de telle façon que la limite de détection soit d'un ordre de grandeur suffisant en dessous de la norme réglementaire de tolérance. Il faut savoir qu'opérer dans la zone du seuil de détection expose obligatoirement à des problèmes de non reproductibilité ou de mauvaise interprétation des résultats obtenus.

### **1.5.- Le taux de récupération**

Ce critère permet de tester l'efficacité en terme de détection d'une méthode. Il est évalué grâce à la réalisation d'une gamme d'ajout. Il faut ajouter une quantité connue d'un standard à un substrat donné puis rapporter ensuite cette valeur connue à la teneur déterminée à la suite de l'analyse.

Grâce à ce critère, les pertes occasionnées par les diverses manipulations au cours de l'analyse sont appréciées. Il est d'autant meilleur qu'il est grand. Cette donnée devrait toujours pondérer les résultats des analyses effectuées. Il se trouve qu'on l'utilise surtout en chromatographie liquide de haute performance. Lors de la création d'une nouvelle méthode ou de l'adaptation d'une méthode déjà existante à un nouveau substrat, le laboratoire se doit de tester en particulier le taux de récupération et la reproductibilité de celle-ci.

## II - Choix de la méthode et objectifs

Il est dicté par le nature de l'information demandée et par l'utilisation des résultats fournis. Il dépend également du type et du nombre d'échantillons à analyser.

Une méthode de recherche de résidus d'antibiotiques a plusieurs objectifs dans le cadre de l'épidémiologie :

- savoir s'il y a absence ou présence d'antibiotiques (quel qu'il soit) dans une denrée donnée ;
- connaître sa nature si possible ;
- sa quantité importe moins, mais elle doit être inférieure à la limite maximale de résidus en vigueur dans le pays.

Chaque méthode a en plus un rôle propre :

- La Méthode de référence : élaborée par un laboratoire de référence qui se charge de la mettre au point, puis de la diffuser. On peut tester la fiabilité d'une nouvelle méthode vis-à-vis de celle de référence.

- Les Méthodes de dépistage ou de présélection ("screening") : ce sont des méthodes rapides effectuées lors de contrôles intensifs ou urgents. Elles sont dites "multirésidus". Ces méthodes de screening doivent donner des résultats significatifs dans le cas de réponses négatives.

Tout résultat positif exige, par contre, une confirmation ultérieure avec une méthode plus complexe et plus sélective. Ces méthodes ont l'avantage de restreindre le nombre d'échantillons qui exigent l'emploi de ces dernières techniques plus longues et plus coûteuses.

- Les Méthodes de routine : ce sont des méthodes d'analyses rapides, simples, mais moins performantes que les méthodes de références officielles. On admet une certaine tolérance sur la précision.

Il faut toutefois évaluer l'impact du gain de temps réalisé par ces techniques en regard de leur performance.

Au total, avec les critères énoncés ci-dessus, le choix d'une méthode est plus aisé ; mais il faut, à l'instar des chercheurs américains, analyser les échantillons dans plusieurs laboratoires différents pour un même prélèvement. Ceci permettrait de voir la variabilité des résultats en dedans et en dehors des laboratoires.

## CHAPITRE DEUXIEME : PRESENTATION DES DIFFERENTES TECHNIQUES

Avant le dosage des résidus, plusieurs étapes sont nécessaires afin de concentrer le principe actif des échantillons. Il s'agit de :

- broyage et homogénéisation : transformation d'un échantillon solide en matière liquide ;
- broyage : à l'aide des solvants, elle permet d'individualiser le principe actif selon sa solubilité ;
- purification : limite les interférences dues à d'autres substances.

Toutes ces étapes peuvent modifier considérablement les résultats observés et être à l'origine d'importantes erreurs.

Parmi les méthodes de dosage actuellement utilisées, l'on peut mentionner les principales indiquées, ci-dessus.

### I - Méthodes Microbiologiques

#### I.1.- Principe

Ces méthodes utilisent la sensibilité de certaines souches bactériennes vis-à-vis d'un ou plusieurs antibactériens.

Plusieurs méthodes sont connues :

- Les Méthodes en milieu liquide sont utilisées pour la détection d'antibiotique dans le lait et dans l'urine selon NOUWS (23). Pour le lait, après pasteurisation, l'échantillon estensemencé à l'aide d'une souche sensible aux antibiotiques. Après incubation, la production d'acide lactique qui témoigne de la croissance du germe-test en l'absence de résidus d'antibiotiques, est révélée soit par un indicateur de pH, soit par une coagulation du lait. Une culture témoin est réalisée avec un échantillon exempt d'antibiotiques.

Plusieurs méthodes reposant sur ce principe, sont utilisées :  
(tableau 11)

Méthodes	Organismes test	Limites de détection dans le lait / ml		Temps d'incubation
<i>Réduction d'indicateurs colorés :</i>				
Resazurine	Lactobactillus bulgaricus (40°C)	0,02-0,05	UI pénicilline	1 h 30
C.T.T.	Str. thermophilus (37°C°)	0,0005 0,2 0,1 1 10	UI pénicilline µg chlortetracycline µg erythromycine µg terramycine µg streptomycine	3 h 30 à 4 h
Bleu de méthylène	Str. thermophilus (37°C)	0,02 0,1 3	UI pénicilline µg tétracycline µg streptomycine	2 h 30 à 3 h
Bromocresol pourpre	Str. thermophilus (45°C)	0,05	UI pénicilline	6 h
<i>Acidification :</i>				
Titration	Str. thermophilus (37°C)	0,0025-0,005 0,2	UI pénicilline µg oxytétracycline µg chlortétracycline µg chloromycétine µg streptomycine	2 h 30 à 3 h
Mesure du temps de coagulation	Strept. therm. Lact. bulg (Flora Damica) (40°C)	0,02 0,03 0,6 0,05-0,06 0,5-0,7 2-3 20-30 0,6-0,8	UI pénicilline µg oxytétracycline µg chloramphénicol µg néomycine µg tétracycline	2 h 30
<i>Mesure de la turbidité</i>	B. stearothermophilus (55-60°C)	0,00002 0,05 à 1 0,003 0,1 à 0,5 0,1 à 0,2	UI pénicilline µg aureomycine µg tétracycline µg streptomycine µg chloramphénicol	1 h 30

Tableau 11 : Détection des antibiotiques dans le lait - Méthodes microbiologiques en milieux liquides (20)

- Réduction d'indicateurs colorés (lait)
  - + test à la résazurine ;
  - + test CTT (chlorure de triphenyl tétrazolium) ;
  - + test au pourpre de bromocresol ;
  - + test au bleu de Méthylène.
  
- Mesure du temps de coagulation (lait)
- Mesure de l'acidité (lait)
- Mesure de la turbidité du milieu.

On compare les variations de densité optique d'une solution contenant un microorganisme test et une autre solution contenant l'échantillon à analyser.

L'extrait contenant l'antibactérien va inhiber la croissance du germe-test et rendre la solution plus claire après une incubation.

- Les méthodes par diffusion en gélose :

Elles reposent sur la diffusion de l'antibactérien mis en contact avec une géloseensemencée avec le microorganisme test dans une boîte de pétri. Après incubation, autour des zones de dépôt de l'antibactérien, il inhibera la croissance des germes, qui est matérialisée par une zone translucide circulaire centrée sur le point de dépôt. Le diamètre observé est proportionnel à la quantité d'antibiotique présent dans le prélèvement. Le mode de dépôt est particulier ; il se fait par des disques imprégnés de la solution à tester ou des puits sont découpés dans la gélose.

## **I.2.- Méthodologie**

Nous avons regroupé dans le tableau n° 12, une description des méthodes microbiologiques trouvées sur le chloramphenicol.

- Le choix des microorganismes : utilisés pour chaque antibiotique, dépend de sa sensibilité envers celui-ci et sur certains caractères culturels :

METHODE	GERME TEST	ECHANTILLON	SENSIBILITE
Turbimétrie	<i>Shigella sonnei</i>	- Sérum - Urine	1 µg/ml
Diffusion sur gélose	<i>Sarcina subflava</i> ACT 7468	Plasma	1,25 µg/ml
Diffusion sur gélose	<i>Sarcina lutea</i>	- Sérum - Lait - Ultrafiltrats	0,5 µg/ml
Diffusion sur gélose	<i>Micrococcus luteus</i>	Viande	5 ppm
Diffusion sur gélose	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	?	1-2 µg/ml

Tableau n° 12 : Dosages microbiologiques du Chloramphenicol dans les milieux biologiques. Source (20).

- ex :
- *Proteus morgani* pour la flumequine
  - *Bacillus cereus* pour la tetracycline
  - *Sarcina lutea* pour le chloramphenicol

- Le choix du milieu de culture : sa composition dépend de la souche utilisée et conditionne la croissance de la souche. On peut utiliser :

- la gélose de HEATLEY
- le milieu proposé par CHABBERTY
- le milieu BACTO WHEY Agar (Difco) etc...

Le pH du milieu varie selon l'antibiotique recherché (conférer tableau n° 13)

Antibiotique recherché	pH du milieu gélifié	Souches Tests
Penicilline	6,6	<i>Sarcina lutea</i> ATC (934)
Streptomycine	7,8	<i>Bacillus subtilis</i> ATC (6633)
chloramphenicol	6,6	<i>Sarcina lutea</i>
Tetracycline	6,6	<i>Bacillus subtilis</i>
Erythromycine	7,8	<i>Sarcina lutea</i>
Spiramycine	7,8	<i>Sarcina lutea</i>

Tableau 13 : pH des Milieux gélifiés et leur souche-test.

Source (20).

- La préparation de l'échantillon : il est placé :
- tel quel (lait, urine...) ;
  - après avoir été mis dans une petite quantité de sérum, physiologique stérile (lait caillé, aliments antibiosupplémentés...) ;
  - après extraction par des solvants (tissus musculaires...).
- L'incubation se fait avec ou sans préincubation, mais généralement à 30°C pendant au minimum 8 heures.



- La lecture des résultats :

- considération d'une zone d'inhibition minimale ;
- mesure du diamètre d'inhibition ;
- localisation de l'échantillon par rapport à une droite étalon.

Il faut tenir compte du fait que la plupart des produits biologiques (sérum, foie, lait, muscle, urine...) ont des propriétés de fixation ou de destruction enzymatique susceptibles de fausser les résultats.

## **II - Méthodes électrophorétiques**

Nous présentons ici la méthode proposée par TAO et POUMEYROL (32).

### **II.1.- Principe**

Il s'agit de faire migrer l'antibiotique d'une cupule creusée dans l'épaisseur d'une couche de gélose étalée sur une plaque de verre horizontale vers une autre cupule par un courant électrique.

### **II.2.- Préparation de l'échantillon**

On met 100 grammes de muscle dans un flacon stérile contenant 200 millilitres d'eau distillée. L'ensemble est homogénéisé à l'ultraturax, puis centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 mn. On recueille le surnageant.

### **II.3.- Réalisation**

On dépose 0,1 ml du surnageant dans une cupule creusée dans l'épaisseur d'une couche de gélose (gélose au tampon veronal pH = 8,6) étalée sur une plaque de verre horizontale ; les deux extrémités de la couche de gélose étant reliées par des ponts à une cuve renfermant un électrolyte (cf. figure 5). Un courant de 150 volts est appliqué aux électrodes de platine de manière à obtenir au niveau de la gélose, une différence de potentiel de 100 volts, qui entraîne la migration des antibiotiques pendant trois heures. Une deuxième couche de gélose (de nature variée : test Agar-Merck pH 6 ou pH 8 ; Antibiotic Medium 4 pH 6

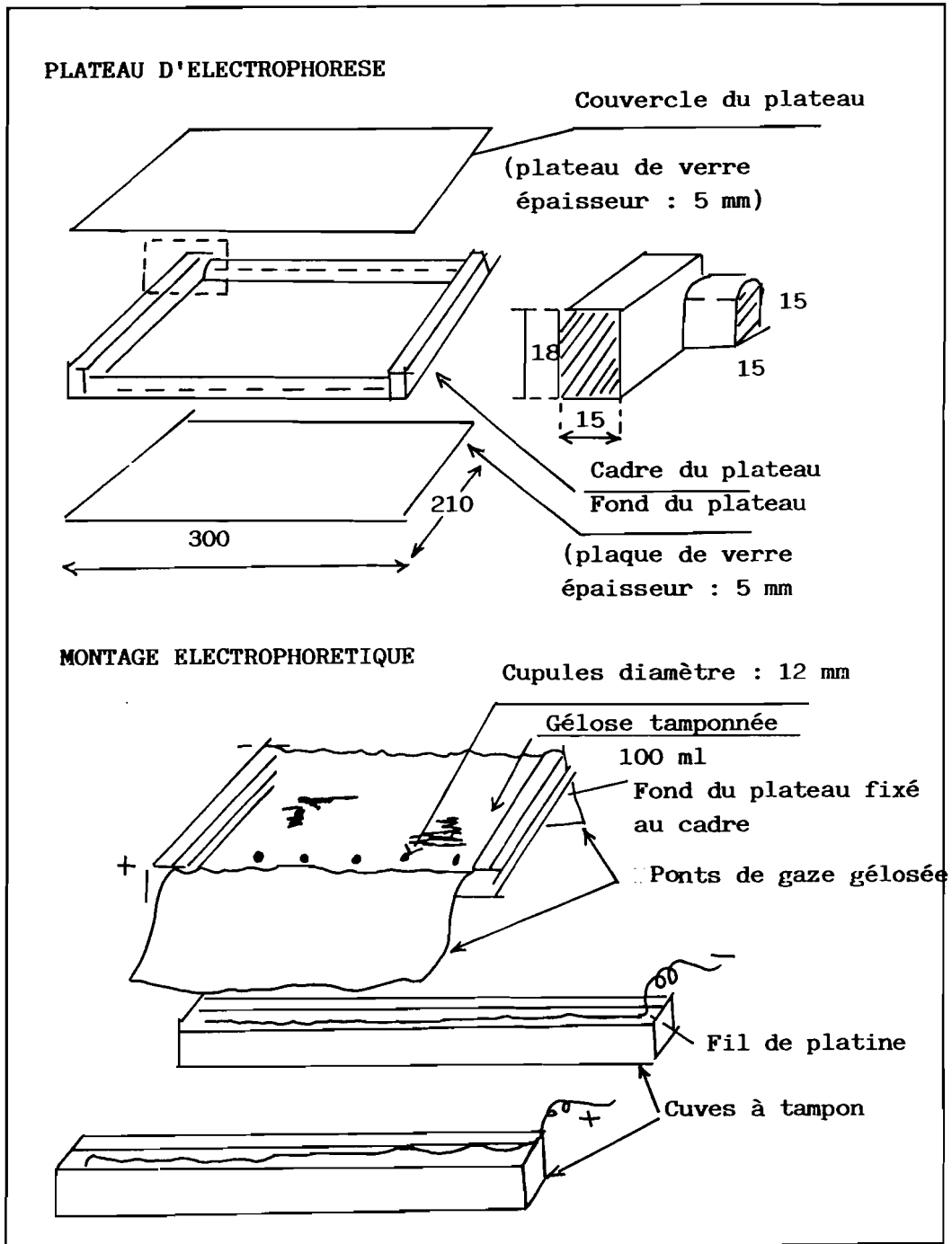


Figure 5 : Appareillage pour la migration électrophorétique.  
D'après TAO et POUMEYROL (32).

ou pH 9) ensemencée avec le microorganisme-Test (cf. tableau 14) révèle après étuvage (à 30-37°C pendant 18 à 24 heures), la diffusion éventuelle d'un ou plusieurs antibiotiques par l'inhibition de la croissance du microorganisme. Un résultat positif se traduit par la formation de zones claires. Le diamètre de ces zones est proportionnel à la concentration de l'antibiotique dans l'aliment avec un seuil de sensibilité.

La méthode électrophorétique permet d'assurer l'élimination des substances interférentes qui gênent la révélation de l'antibiotique.

#### **II.4.- Résultats**

Cette méthode permet le dosage, l'identification de la plupart des antibiotiques ; mais la quantification reste difficile.

Il existe une autre technique : l'électrophorèse à haute tension (3000 volts et 250 mA) permettant d'améliorer les résultats par l'électrophorèse classique.

#### **III.- Méthodes colorimétriques**

La méthode décrite par GROVE et RANDALL, modifiée par LASERRE (16) nous servira de modèle pour décrire ces méthodes colorimétriques. Celle-ci est utilisée pour la recherche de chloramphenicol dans la chair de poisson.

##### **III.1.- Principe**

Le groupement nitrobenzène est couplé après diazotation à une autre molécule : le corps qui en résulte à une coloration violette dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de chloramphenicol initiale ; son appréciation spectrophotométrique permet de déterminer le dosage.

Antibiotiques	Microorganismes	Milieu (migration)	Milieu (révélation)	Durée et température d'incubation	Seuil de sensibilité
Spiramycine	M. Luteus	Véronal pH 8.6	Antibiotic médium 4 pH 9	18h - 30°C	0,02 µg/ml
Erythromycine	M. Luteus	Idem	Idem	18h - 30°C	0,01 µg/ml
Orléandomycine	B. cereus	Idem	Idem	18h - 30°C	0,05 µg/ml
Tylosine	M. Luteus	Idem	Antibiotic M4 pH 9	18h - 30°C	0,5-0,2 µg/ml
Strept.	B. subtilis	Idem	Test agar pH 8	18h - 30°C	0,5 µg/ml
Néomycine	B. subtilis	Idem	Antibiotic M4 pH 9	18h - 30°C	0,5 µg/ml
Chlortétracycline	B. cereus	Idem	Test agar pH 6 ou 8	18h - 30°C	0,2 µg/ml
Chloramphénicol	B. subtilis	Idem	Antibiotic M4 pH 6 ou 9	18h - 30°C	5 µg/ml
Polymyxine B	M. luteus	Idem	Antibiotic M4 pH 9	18h - 30°C	5 - 10 µg/ml
Virginiamycine	B. subtilis	Idem	Test agar pH 9	18h - 30°C	0,2 µg/ml
Bacitracine	M. luteus	Idem	Test agar pH 6 ou 8	18h - 30°C	0,2 U/ml
Penicilline	M. luteus	Idem	Antibiotic M4 pH 6 ou 9	18h - 30°C	0,2 U/ml
Framycétine	B. subtilis	Idem	Antibiotic M4 pH 6	18h - 30°C	0,5 µg/ml
	B. stearothermophilus	Idem	Test agar pH 6 ou 8	24h - 55°C	0,02 U/ml
	B. subtilis	Idem	Antibiotic M4 pH 6 ou 9	18h - 30°C	0,5 µg/ml

Tableau n° 14 : Récapitulatif de la méthode électrophorétique. D'après TAO et POUMEYROL (31).

N.B./ Au cours des essais effectués, pour chacun des antibiotiques testés, nous avons effectué les révélations microbiennes, avec les 4 espèces microbiennes : M. luteus, B. subtilis, B. cereus, Staphylococcus aureus (et B. stearothormophilus) , nous n'avons indiqué dans ce tableau que les espèces microbiennes ayant donné une réponse positive.

B. stéarothormophilus n'a été utilisé que pour la Pénicilline.

### III.2.- Mode opératoire

Les tissus sont broyés pendant 3 mn dans le solvant qui est un mélange de chloroforme (2 parties) et d'acétate d'éthyl (1 partie) 0 5 ml de solvant programme de tissu. Le broyat est centrifugé à 5900 g pendant 10 mn à +10°C. Le solvant est repris et traité suivant les étapes indiquées dans la figure 6.

### III.3.- Evaluation de la méthode (8)

En eau distillée, GROVE et RANDALL estiment la sensibilité à 0,1 µg/ml. LASERRE quant à lui, l'évalue à 0,6 µg/ml. Il précise que le but de ce dosage était plus de connaître la cinétique que la valeur exacte des teneurs.

Les imprécisions de cette méthode sont dues aux défauts de la réaction chimique. La précision est telle qu'entre 5 µg et 50 µg, les résultats sont donnés à 10% près. AU-dessus de 50 µg, l'erreur est encore plus importante.

## IV.- Les méthodes chromatographiques

### IV.1.- Chromatographie sur couche mince : C.C.M.

#### - Principe

L'antibiotique recherché, est séparé des autres substances de l'échantillon à analyser par une différence de migration. On repère la tâche sur la plaque et on détermine le rapport frontal (rf) sous une lampe à U.V., qu'on compare avec l'antibiotique de référence.

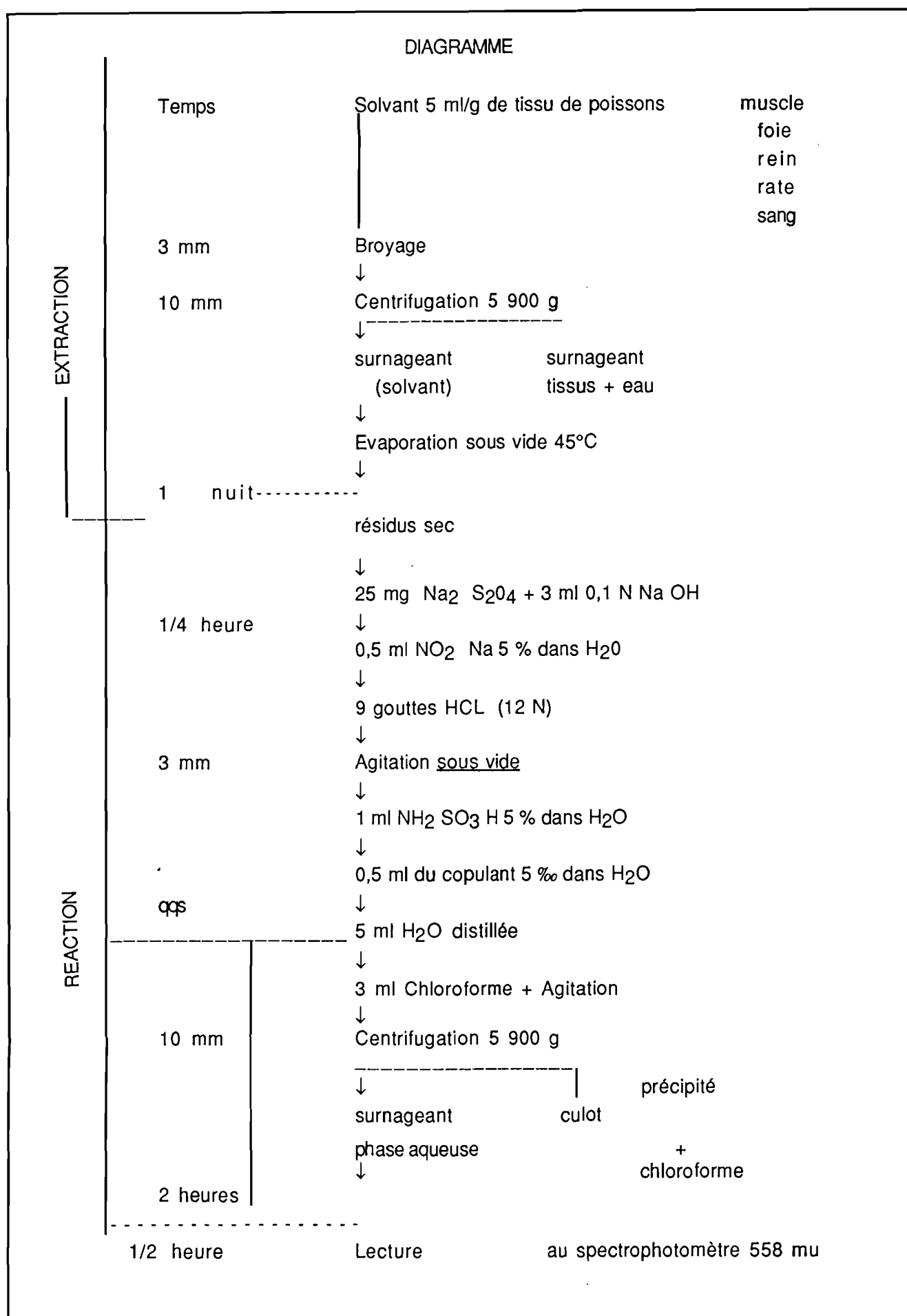


Figure 6 : Diagramme des étapes de la méthode colorimétrique selon LASSERE (16).

- Mise en oeuvre

Sur une plaque H.P.T.L.C. de silice, on dépose 10 µg de chacune des 6 solutions représentant la gamme étalon de l'antibiotique recherché (de 0,1 µg à 1 µg). Cette gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère issue d'une dissolution du composé dans un solvant. La plaque est placée dans une cuve étanche contenant le solvant de migration. La migration varie suivant les antibiotiques (environ 30 mn). La lecture se fait sous lampe U.V à une longueur d'onde donnée. L'antibiotique donne une tâche caractéristique.

- Evaluation de la méthode

Le taux de récupération est médiocre pour une limite de détection peu satisfaisante (tableau n° 15).

Antibiotique recherché	pH du milieu gélosé
Tétracycline	0,025 µg/ml
Chloramphenicol	1 µg/ml
Neomycine	15 µg/ml
Streptomycine	0,5 µg/ml
Flumequine	200 ppb

Tableau n° 15 : Limite de détection de quelques antibiotiques par C.C.M.  
Source (20).

#### IV.2.- Le chromatographie liquide de haute performance ou HPLC (High Performancy liquid chromatography)

- Principe

Cette technique permet de séparer les composés d'un soluté par le principe de la chromatographie d'adsorption sous haute pression.

Ces composés sont mélangés à la phase mobile, et séparés par les retards de sortie au niveau de la phase stationnaire sur certains éléments du soluté (cf. figure 7).

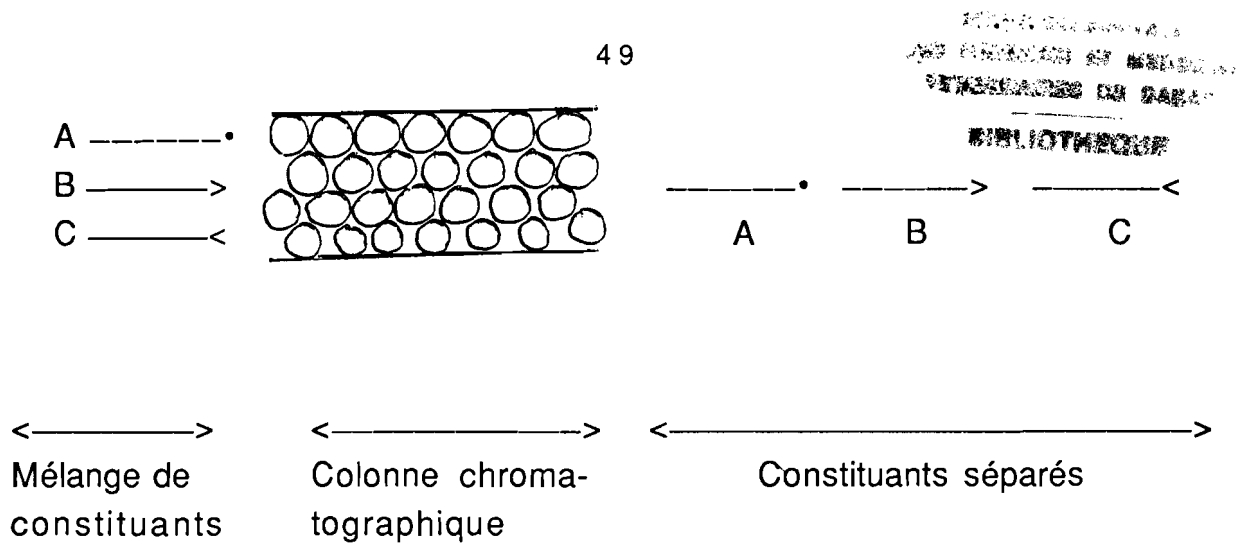


Figure n° 7 : Séparation d'un mélange de 3 constituants par chromatographie. Source (17).

Le schéma classique de l'HPLC est montré en figure 8.

\* Phase mobile : liquide de nature variable et constitue l'éluant délivré de manière isocratique. L'éluant est un mélange de solvants dans des proportions fixes. Il est injecté sous pression par une pompe, à un débit donné.

\* Phase stationnaire : solide et de nature variée (silice le plus souvent) et de porosité variable. Elle est contenue dans une colonne de dimension variable.

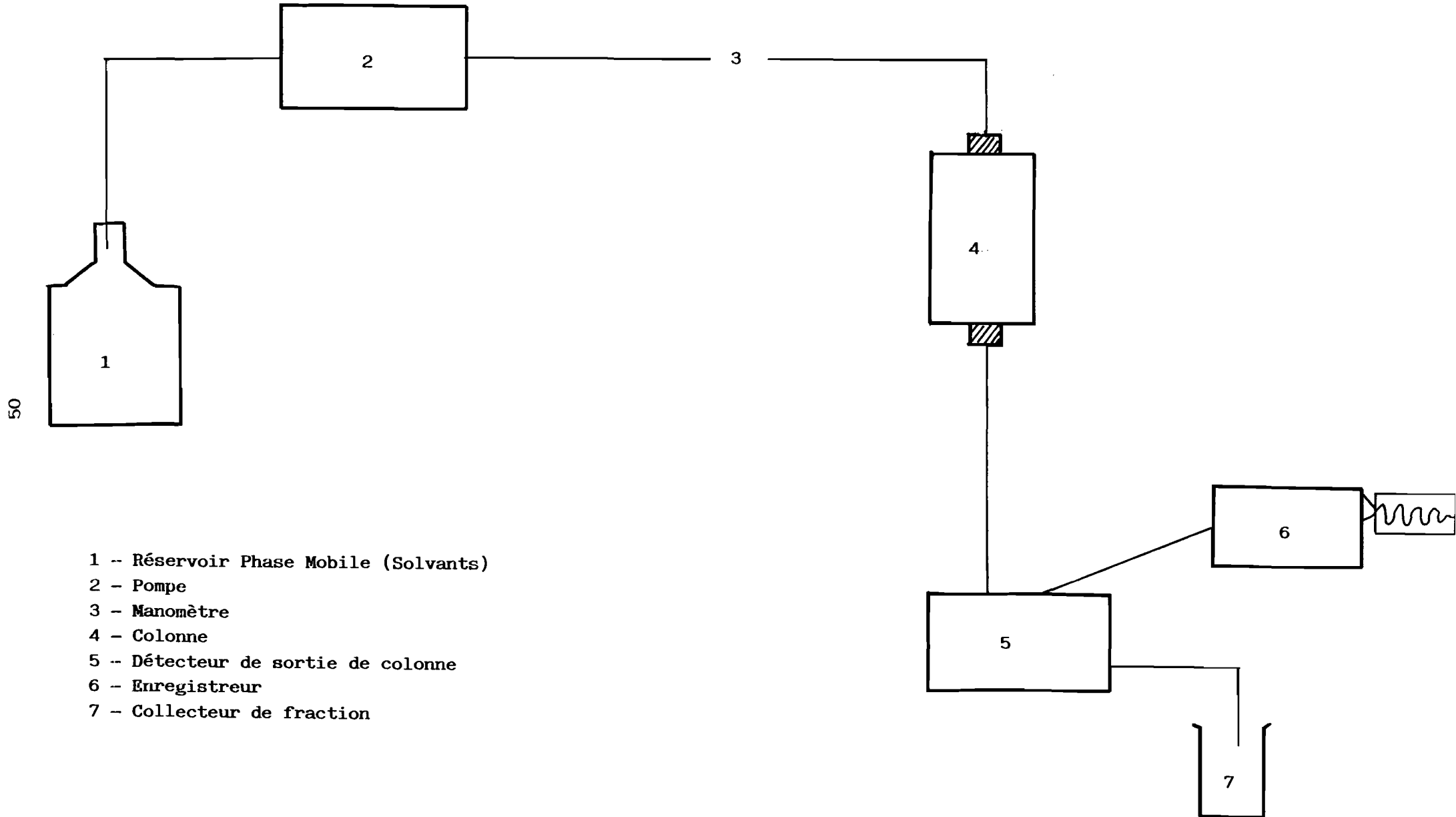
\* L'échantillon à analyser est injecté au niveau du manomètre à l'aide d'une seringue sous un volume bien défini. Il est mélangé à ce niveau à la phase mobile.

\* Le mélange échantillon - Phase mobile est élué dans la colonne et leur détection se fait par un détecteur de sortie (U.V., fluorimétrie, radioactivité, polarographie, etc...). Un enregistreur transcrit en pics, la détection des différentes substances.

Chaque substance est caractérisée par un pic apparaissant après un temps de latence appelé temps de rétention. Les antibiotiques ont une longueur d'onde donnée, spécifique à la méthode dans le cas de la détection en U.V.



Figure n° 8 : Schéma classique du C L H P



- 1 -- Réservoir Phase Mobile (Solvants)  
2 - Pompe  
3 - Manomètre  
4 - Colonne  
5 - Détecteur de sortie de colonne  
6 - Enregistreur  
7 - Collecteur de fraction

- Mise en oeuvre

\* Préparation des échantillons : varie en fonction de la méthode utilisée et de l'antibiotique à analyser.

\* Les appareils diffèrent également ; mais le mode de détection en U.V. est le plus répandu, avec des longueurs d'ondes caractéristiques de chaque antibiotique :

- chloramphenicol :  $\lambda = 280$  nm ou 278 nm
- tetracycline :  $\lambda = 355$  ou 365 nm
- ampicilline :  $\lambda = 222$  nm

La comparaison des différentes méthodes d'analyses par HPLC se fera par confrontation :

- des taux de récupération ;
- des limites de détection ;

pour une famille d'antibiotiques donnée.

#### IV.3.- Chromatographie en phase gazeux (C.P.G.)

ALLEN cité par DENIER (8) le présente comme la plus sensible (1 ppb) pour la détection du chloramphenicol dans les tissus animaux, le lait et les oeufs.

Le matériel, en général, utilisé, est un chromatographe en phase gazeuse, couplé à un détecteur de masse (C.P.G.-S.M.).

- Caractéristiques du C.P.G.

- \* Colonne capillaire en silice fondue ;
- \* Le gaz vecteur est l'hélium, à débit variable avec la méthode utilisée.

- Le spectromètre de Masse (SM) est utilisé en mode sélectif.

Pour le chloramphenicol, on utilise le volume restant après analyse par HPLC, puis on effectue une suite de manipulation. Enfin, on l'injecte pour l'analyse par CPG-SM. Le temps de rétention est de 11,5 minutes et la limite de détection de 1 ppb.

## V - Les Méthodes Immunologiques (8)

### V.1.- Principe de la méthode radioimmunologique (RIA : radioimmunoassay)

RATTENBERGER et coll. cité par DENIER (8) ont mis au point chez la truite, la méthode radioimmunologique appliquée au chloramphenicol. Cette technique est basée sur la propriété fondamentale qu'ont les anticorps de se lier aux antigènes correspondants et l'utilisation d'un antigène radioactif permet la visualisation et la quantification de la réaction. Il faut synthétiser un dérivé du chloramphenicol car le chloramphenicol seul, n'est pas immunogène et il est fixé sur une protéine (B.S.A.) afin d'obtenir un Ag capable de déclencher la synthèse d'anticorps anti CAP chez l'animal. L'extraction des résidus de CAP dans les échantillons est effectuée. Puis une quantité de CAP marquée au tritium (CAP\*) est mise en compétition avec la quantité à déterminer de chloramphenicol présent dans l'extrait ainsi réalisé, au niveau des sites de liaison des anticorps antichloramphenicol (Ac anti CAP) dont la quantité est fixée. Ainsi on a :



La quantité de CAP tritié et d'anticorps anti CAP étant constante, toute adjonction de CAP par l'échantillon entraîne :

- une diminution de la quantité de CAP\* lié à l'anticorps anti CAP ;
- une augmentation de la quantité de CAP\* libre qui est fonction de la quantité de CAP présent dans l'échantillon.

Les molécules de CAP\* libres sont séparées de celles de CAP\* liés par adsorption au charbon dextran (qui adsorbe les molécules libres).

On centrifuge. Le précipité contient donc les molécules de CAP\* libres. la radioactivité dans le surnageant est alors mesurée grâce à un

compteur à scintillation. La valeur mesurée est reportée sur des courbes standards obtenues avec des quantités de CAP connues.

ARNOLD et SOMOGYI (1) avec leur méthode mise au point en 1982, permettent de détecter jusqu'à 0,1 ppb de CAP.

La R.I.A est utilisée surtout par les laboratoires de référence car elle est délicate à mettre en oeuvre, en particulier la préparation des anticorps spécifiques. C'est une méthode jugée trop lourde pour des contrôles de routine.

### **V.2.- Principe de la méthode E.L.I.S.A. (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay)**

Cette méthode met en jeu la compétition entre l'antibactérien de l'échantillon et le même antibactérien, mais marqué par un enzyme au niveau des sites de fixation à un anticorps.

La substance marquée a, lorsqu'elle est liée à l'anticorps une activité enzymatique catalysant l'activité d'un substrat. Cette réaction est couplée à une deuxième réaction qui s'accompagne de l'apparition d'une substance absorbant en spectrophotométrie d'absorption moléculaire à une longueur d'onde donnée. La quantité de substance formée, est évaluée par mesure de la densité optique du milieu réactionnel à cette longueur d'onde, qui est fonction de sa concentration : celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme actif donc à la quantité d'antibactérien lié à l'anticorps et, par conséquent, inversement proportionnelle à la concentration en antibactérien de l'échantillon. C'est une méthode très spécifique, précise et reproductible. Les antibiotiques les plus souvent dosés avec cette méthode sont : la pénicilline, la gentamycine, la tobramycine et le chloramphenicol.

### **VI - Dosage fluorimétrique**

Elle est décrite par CLARENBURG et RAO (6).

Le groupement nitré du CAP est réduit par chauffage avec de la poudre de Zn en milieu chlorhydrique. L'amine aromatique obtenue est couplée avec de la fluoescamine à pH 4,3 - 5,0 et la fluorescence est

lue immédiatement. Puis elle est comparée à celle obtenue à partir d'un échantillon non réduit. Une extraction préalable est réalisée en milieu aqueux en présence de  $Zn SO_4$  et  $Ba (OH)_2$ .

Selon les auteurs, la sensibilité de cette méthode est de 0,1 ppm pour le muscle ; 0,6 ppm pour le foie et la bile. Comme la méthode colorimétrique, elle dose le chloramphenicol et l'ensemble de ces métabolites possédant un groupement p-nitrophenyle, y compris les dérivés glucuronoconjugués.

## VII - Dosage par polarographie

VAN DER LEE et coll. (33) ont dosé les résidus de chloramphenicol dans le sérum et dans le lait par polarographie différentielle à courant pulsé (high performance differential pulse polarography) après extraction par l'éther éthylique et reprise par un tampon acétique. La sensibilité de cette méthode est de 20 ppb. La Polarographie donne des résultats comparables à ceux de l'HPLC, mais fait appel à un appareillage moins courant.

En résumé de cette seconde partie, nous pouvons dire que :

- les Méthodes microbiologiques sont sensibles mais non spécifiques, car elles induisent le risque d'avoir des faux positifs. Elles ne permettent pas l'identification de l'antibiotique, pourtant c'est une méthode rapide ne nécessitant pas un matériel de laboratoire important ;

- les Méthodes électrophorétiques permettent l'élimination des faux positifs grâce à la séparation des substances interférentes, l'identification (peu précise) de l'antibiotique, leur dosage et les limites de détection plus ou moins selon les antibiotiques ;

- les Méthodes chromatographiques :

- \* sur couche Mince (C.C.M.) : permet l'identification de l'antibiotique, mais non le dosage. On pourrait l'utiliser en complément des méthodes microbiologiques et colorimétriques. La limite de détection est de 0,01 ppm.

\* HPLC et CPG-SM : permettent l'identification et le dosage des antibiotiques. Pour le chloramphenicol, l'identification serait meilleure avec la CPG, mais l'HPLC est spécifique et surtout moins compliquée, moins longue à mettre en oeuvre.

Au total, l'HPLC a une sensibilité légèrement inférieure à celle de la CPG (0,05 à 0,005 ppm).

- Les Méthodes colorimétriques et fluorimétriques : peu spécifiques, leur sensibilité pour les tissus peut atteindre 0,1 ppm pour le chloramphenicol, mais elles paraissent insuffisantes.

- Les Méthodes immunologiques et polarographiques : spécifiques permettent un dosage précis.

En Afrique, on recherche une méthode reproductible, simple, à exécution rapide mais précise et surtout pas chère. Pour cela, nous proposons la méthode microbiologique pour les contrôles de routine et l'HPLC suffisamment sensible et de réalisation pratique pour l'identification et surtout la quantification des Antibiotiques.

**TROISIEME PARTIE**

**RECHERCHE DE RESIDUS DE**

**CHLORAMPHENICOL CHEZ LES RUMINANTS EN**

**COTE-D'IVOIRE PAR LA METHODE HPLC**

Pour cette partie expérimentale, nous avons utilisé la méthode HPLC de référence du Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaire (C.N.E.V.A.) réalisée en Septembre 1990 en France. Dans le premier chapitre, nous présenterons le Matériel et la Méthode, puis le second chapitre traitera des résultats et de la discussion.

## CHAPITRE PREMIER : MATERIEL ET METHODE

La Méthode utilisée émane du laboratoire des médicaments vétérinaires (L.M.V.) dépendant du C.N.E.V.A.

Les prélèvements de viande ont été faits dans les différents abattoirs de trois villes représentant les régions du centre, du nord et du sud-est de la Côte d'Ivoire. Ces prélèvements ont intéressé les espèces bovines, caprines et ovines.

Dans ce chapitre, nous décrivons l'échantillonnage et le matériel de laboratoire, puis nous parlerons de la méthode d'extraction et les conditions chromatographiques pour obtenir des résultats quantitatifs et qualitatifs.

### I.- Matériel

#### I.1.- Echantillonnage

Les échantillons sont des petites quantités de muscle prélevés sur des carcasses de bovins, ovins et caprins. Chaque prélèvement est fait sur un seul animal.

Comme le problème de résidus intéresse en priorité l'homme, nous avons voulu avoir des résultats sur les villes les plus importantes. Pour cela, nous avons choisi ABIDJAN (sud-est), BOUAKE (centre) et KORHOGO (nord) (voir carte).

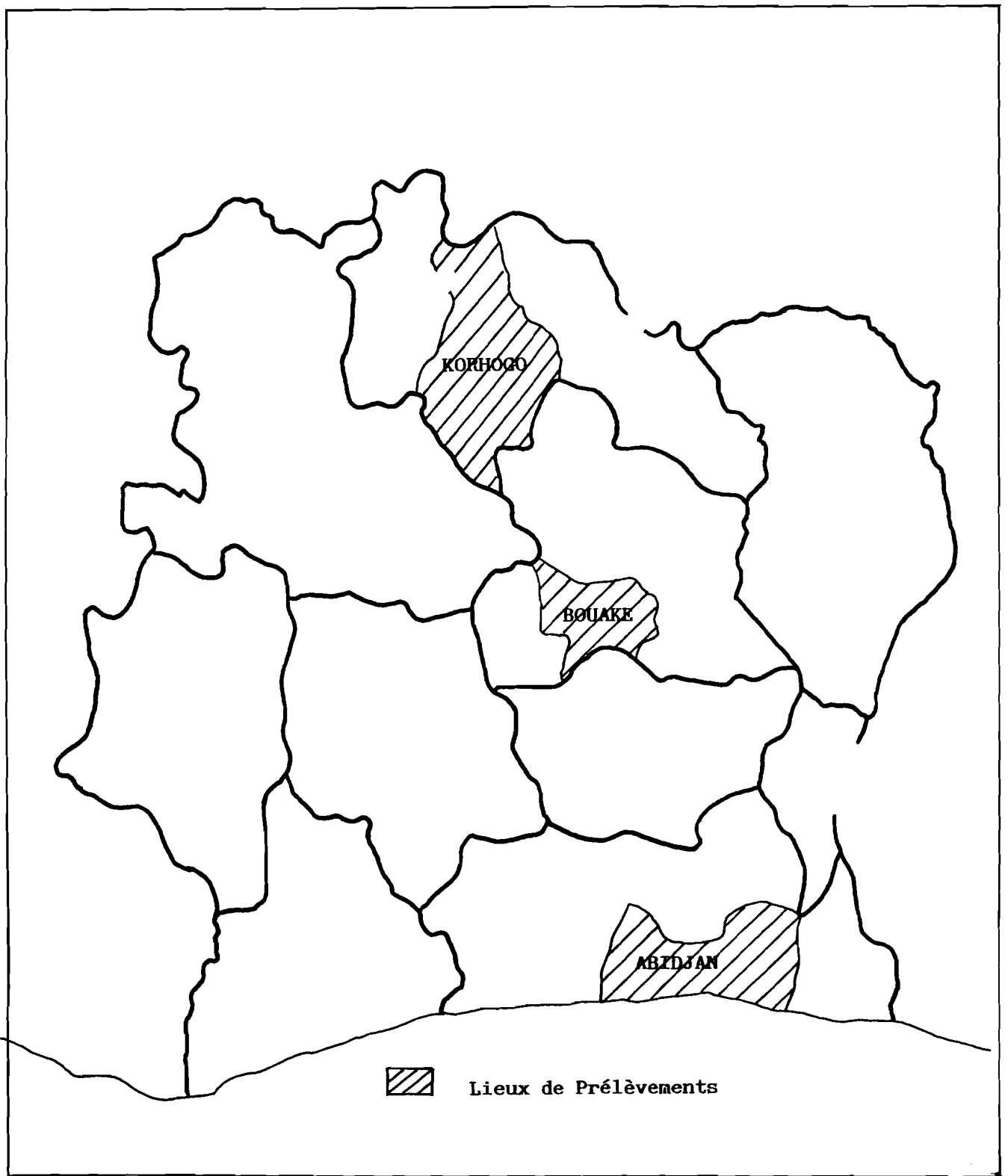
Au niveau d'ABIDJAN, nous avons :

\* Pour les bovins :

- 25 échantillons prélevés dans une société d'importation (L.G.A. = La Générale d'Alimentation)
- 25 échantillons prélevés à l'abattoir.

\* Pour les ovins : 75 échantillons





Carte : Lieux de prélèvement

Au niveau de BOUAKE, on a :

- \* Pour les bovins : 25 échantillons ;
- \* Pour les ovins : 25 échantillons.

Au niveau de KORHOGO, on a prélevé 25 échantillons au niveau de la race bovine uniquement.

Le tableau 16 récapitule ces données.

	ABIDJAN	BOUAKE	KORHOGO	CUMUL
Bovins	50	25	25	1000
Ovins-Caprins	75	25	00	100
Total	125	50	25	200

Tableau n° 16 : Echantillonnage selon la ville et l'espèce.

Nous avons au total 200 prélèvements dont 100 de caprins-ovins et 100 de bovins.

#### I.1.1.- Récolte de l'échantillon

Le prélèvement des échantillons a été fait au hasard sur les carcasses. Nous avons prélevé des quantités de viande supérieure à 15 g au niveau des muscles cervicaux dorsaux afin d'éviter une quelconque souillure. Les échantillons prélevés sont mis dans des sachets de plastique dans lesquels le vide a été fait. Les sachets sont, au préalable, identifiés par un numéro à l'aide d'un marqueur. Nous déterminons ensuite le sexe de l'animal, sa provenance et l'espèce.

#### I.1.2.- Procédure d'échantillonnage

Les échantillons après les prélèvements, sont conservés dans une glacière pour le transport, puis sont congelés à -20°C ; le même procédé a été utilisé pour les échantillons prélevés à l'intérieur du pays (Korhogo et Bouaké).

Le délai qui s'est écoulé entre le premier prélèvement et le début des analyses est de 1 mois.

## I.2.- Matériel de laboratoire

Ce matériel comprend :

### I.2.1.- Verrerie

- Tubes à centrifuger de 15 ml en verre à col rodé ;
- Tubes à centrifuger de 5 ml ;
- Ballons de 20 ml à col rodé ;
- Pipettes en verre de 10 ml, 5 ml, 1 ml ;
- Fioles jaugées de 50 et 100 ml à col rodé ;
- Bouchons en polyéthylène adaptables à la verrerie à col rodé ;
- Tube en plastique de type EPPENDORF avec bouchon adapté.

### I.2.2.- Réactifs

- Acétate d'éthyle pour analyse (MERCK 9623) distillé à l'évaporateur rotatif avant l'emploi ;
- Chloroforme pour analyses (MERCK 2445) ;
- Hexane pour analyses (MERCK 4367) ;
- Méthanol pour analyses (MERCK 6009) ;
- Eau bidistillée, dégazée, filtrée sur micropores ;
- Réactifs pour le chromatographie (voir phase mobile).

### I.2.3.- Autres matériels

- Agitateur électrique pour tubes à essais, type HEIDOLPH ;
- Evaporateur rotateur, type HEIDOLPH ;
- Centrifugeuse réfrigérée, type JOUAN GR 4.11 réglée à 20°C.
- Agitateur magnétique, type ABOVOLT ;
- Hachoir électrique, type Moulinex, Moulinette ;
- Balance de précision, type METTLER PE 3000 ;
- Cuve à ultrason, type HEIDOLPH.

### I.2.4.- Ensemble chromatographique

- Pompe HPLC type BECKMAN 110B solvant delivery module ;
- Détecteur ultra-violet, type BECKMAN 163 variable wavelenght detector ;

- Calculateur-intégrateur, type BECKMAN, 427 integrator
- Injecteur avec boucle de 20  $\mu$ l, type RHEODYNE 7125 ;
- Colonne à phase greffée C18, cat 50433 licrosorb RP-18 (5  $\mu$ m), type MERCK ;
- Seringue en verre de 0,25 ml pour chromatographie, type HAMILTON.

## II.- Méthode

### II.1.- Extraction du chloramphenicol

L'extraction du chloramphenicol a été faite à la Faculté de Pharmacie d' ABIDJAN dans le laboratoire de Toxicologie ; les après-midi de 14h à 19 heures.

On procède ainsi :

- Décongeler l'échantillon à température ambiante ;
- Broyer la viande au hachoir ;
- Peser 5 g de broyat et les transférer dans un tube à centrifuger de 15 ml ;
- Ajouter 2 ml d'eau et boucher ;
- Agiter 1 minute à vitesse maximum ;
- Ajouter 6 ml d'acétate d'ethyle distillé et boucher le tube avec le même bouchon ;
- Agiter 1 minute à vitesse maximum ;
- Laisser reposer 10 minutes ;
- Agiter 1 minute à vitesse maximum ;
- Centrifuger 10 minutes à 2000 g.

On observe 3 phases : - au fond : un résidu solide  
- au milieu : une phase aqueuse  
- au dessus : une phase organique

- Prélever 4,2 ml de la phase organique ;
- Transférer dans un ballon ;
- Evaporer à sec à 30°C environ.

Il faut s'assurer qu'il ne reste plus d'acétate d'ethyle, mais seulement un résidu huileux.

- Reprendre le résidu par 1,4 ml d'un mélange hexane-chloroforme 1-1 V/V ;
- Ajouter 0,7 ml d'eau et boucher le ballon ;
- Agiter pendant 10 minutes ;
- Transvaser le contenu dans un tube ;
- Centrifuger 20 minutes à 2000 g ;

Il faut recommencer la centrifugation si la séparation des deux phases est jugée incomplète.

- Prélever une quantité suffisante de surnageant supérieure à 100  $\mu$ l et injecter dans le système chromatographique.

## **II.2.- Mise au point des conditions chromatographiques pour les résultats quantitatifs et qualitatifs**

L'analyse chromatographique a été faite au LACENA (Laboratoire Central de Nutrition Animale d'Abidjan), les matins de 8 heures à 12 heures.

### **II.2.1.- Conditions opératoires**

Certaines manipulations ou différents paramètres peuvent être à l'origine de la variation des résultats :

- la composition de la phase mobile :

- acétonitrile : 21 %
- tampon ammonium (pH 7,9) : 79 %

**N.B./** Le tampon ammonium est préparé par dissolution de 0,66 g d'hydrogenophosphate d'ammonium dans un litre d'eau.

Avant l'utilisation, ce mélange est dégazé pendant 30 minutes dans une cuve à ultrason et filtré.

- La température : pour obtenir des résultats très reproductibles, il aurait fallu travailler à température constante, or ni le réservoir de solvant, ni la colonne ne sont thermorégulés.

Nous avons travaillé en température ambiante (28°C à 34°C), on peut donc s'attendre à des variations d'efficacité de la colonne. Une augmentation de la température provoque, en général, une diminution de la résolution.

Tous les échantillons ont été placés dans les conditions du laboratoire avant l'analyse.

- La pompe a été utilisée avec un débit de 1 ml/minute.

- La même colonne a servi pour tous les dosages sans précolonne. Elle est lavée après chaque série d'échantillons par du méthanol.

- Le détecteur ultra-violet :

- longueur d'onde : 278 nm
- sensibilité :  $s = 0,02$

La sensibilité est définie comme la quantité de substance telle que le rapport du signal du détecteur ou bruit de fond soit égal à 2. Cette quantité minimale détectable ne dépend pas seulement de la sensibilité du détecteur, mais aussi de la nature du soluté, de la colonne etc...

- L'intégrateur : le signal électrique émis par le détecteur est envoyé en permanence à l'intégrateur qui détermine l'aire comprise entre le tracé de ce signal et la ligne de base, en fonction du temps. Ces surfaces sont exprimées en millivolts par seconde ( $mv/s^{-1}$ ).

+ Le taux d'échantillonnage réglée par la fonction PKWD (Peak Witch) ou P.W permettant de reconnaître les pics, a été mis à  $PW = 10$ .

+ L'atténuation permet d'atténuer l'amplitude du signal électrique transmis par le détecteur. On utilise  $At = 8$ .

## II.2.2.- Temps de rétention

Le temps de rétention d'un composé est le temps (ou la distance mesurée sur le chromatogramme) séparant le point d'injection et le maximum du pic de ce composé. Il est caractéristique d'un composé, mais non spécifique.

Le tableau 17 montre les différents temps de rétention observés. La moyenne observée est de 6,65 mn.

Nombre d'essais	Temps de rétention	Moyenne
1	5'61	6,65
2	6'20	
3	7'66	
4	6'80	
5	7'08	
6	6'55	

Tableau n° 17 : Temps de rétention du CAP dans du muscle de ruminants domestiques

Ces fluctuations sont dues :

- au fait que le déclencheur de l'intégrateur affichant les temps de rétention se fait manuellement, simultanément à la manipulation de la vanne d'injection ;

- à la variation de température lors des analyses, ce qui entraîne une modification de la solubilité de l'échantillon, et de la viscosité de la phase mobile, puis affecte l'efficacité de la colonne.

## II.2.3.- Courbe d'étalonnage

### II.2.3.1.- Préparation des standards

La solution étalon-mère a été préparée à partir du chloramphenicol livré par le laboratoire ROUSSEL.

- **Solution n° 1 à 500  $\mu\text{g/ml}$**

Peser une quantité de chloramphenicol correspondant à 50 mg de matière active dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 2 ml de méthanol et dissoudre le chloramphenicol par agitation douce. Compléter à 100 ml avec de l'eau. Cette solution n° 1 est dégazée et homogénéisée dans une cuve à ultrasons pendant 30 minutes. Cette solution se conserve deux semaines à 4°C.

Dans le protocole du C.N.E.V.A., on utilise une boucle de 200  $\mu\text{l}$  tandis qu'au LACENA, nous ne disposons que d'une boucle de 20  $\mu\text{l}$  ; pour cela, nous avons augmenté les concentrations suivantes de 10 fois pour avoir des résultats semblables.

- **Solution n° 2 à 50  $\mu\text{l/ml}$**

Prélever 1 ml de la solution n° 1 dans un flacon de 10 ml. Compléter à 10 ml avec de l'eau.

- **Solution n° 3 à 1000 ng/ml**

Prélever 1 ml de la solution n° 2 dans un flacon de 5 ml. Compléter à 5 ml avec de l'eau.

- **Solution n° 4 à 750 ng/ml**

Prélever 0,75 ml de la solution n° 2 dans un flacon de 5 ml. Compléter à 5 ml avec de l'eau.

- **Solution n° 5 à 500 ng/ml**

Prélever 1 ml de la solution n° 2 dans un flacon de 10 ml. Compléter à 10 ml avec de l'eau.

- **Solution n° 6 à 250 ng/ml**

Prélever 0,5 ml de la solution n° 2 dans un flacon de 10 ml. Compléter à 10 ml avec de l'eau.



### II.2.3.2.- Injection des standards

Seules les solutions n° 3, 4, 5 et 6 sont injectées.

### II.2.3.3.- Résultats

Le tableau 18 montre les résultats obtenus.

Concentration des étalons en $\mu\text{g/ml}$		Nombre d'essai réalisés par concentration	Surface moyenne des pics en $\text{uv.s}^{-1}$
N° 3	20 $\mu\text{g/ml}$	4	149.672
N° 4	15 $\mu\text{g/ml}$	4	108.112,5
N° 5	10 $\mu\text{g/ml}$	4	66.797,5
N° 6	5 $\mu\text{g/ml}$	4	26.473,5

Tableau n° 18 : Résultats des étalons de la méthode

Le principe de base de l'HPLC, lorsqu'elle est utilisée comme méthode de dosage, repose sur une relation de proportionnalité entre la masse de produit injectée et la surface du pic correspondant (figure n° 9). Pour cette droite d'étalonnage, il a été utilisé en ordonnées, les surfaces de pics en  $\text{uv.s}^{-1}$  et en abscisses, les concentrations de chloramphenicol en  $\mu\text{g/ml}$ . On obtient la droite  $y = ax + b$  : égale à  $y = 165749 x - 16077$ .

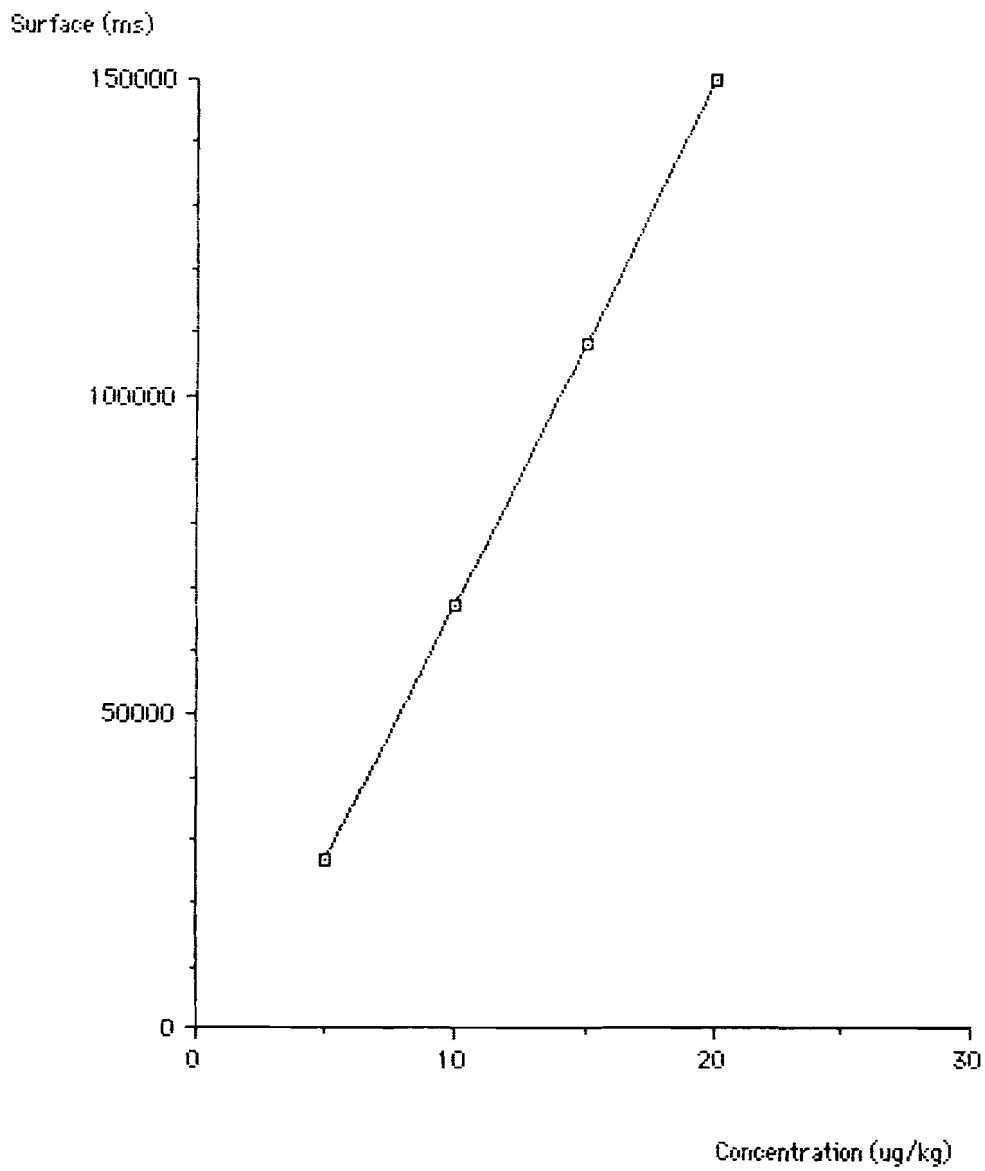
La figure 10 nous montre deux chromatogrammes réalisés avec l'étalon n° 4 de 15  $\mu\text{g/kg}$ .

La concentration en chloramphenicol peut être déterminée en rapportant les surfaces de pics obtenus pour les échantillons en tenant compte du rendement d'extraction à la droite d'étalonnage.

### II.2.4.- Rendement d'extraction

#### II.2.4.1.- Mode opératoire

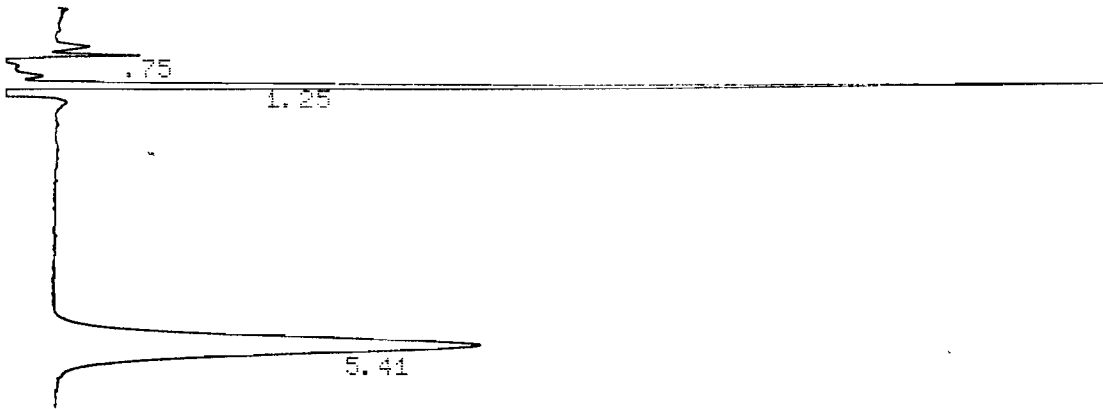
Des prélèvements de viande ont été faits sur des animaux jeunes (veaux et agneaux) n'ayant pas reçu de chloramphenicol. Avant l'utilisation, la confirmation au H.P.L.C. a été établie. Le procédé suivant a été suivi pour la supplémentation :



**Figure 9 : Courbe d'étalonnage du Chloramphenicol**

Etalon 4 = 15 ug/ml

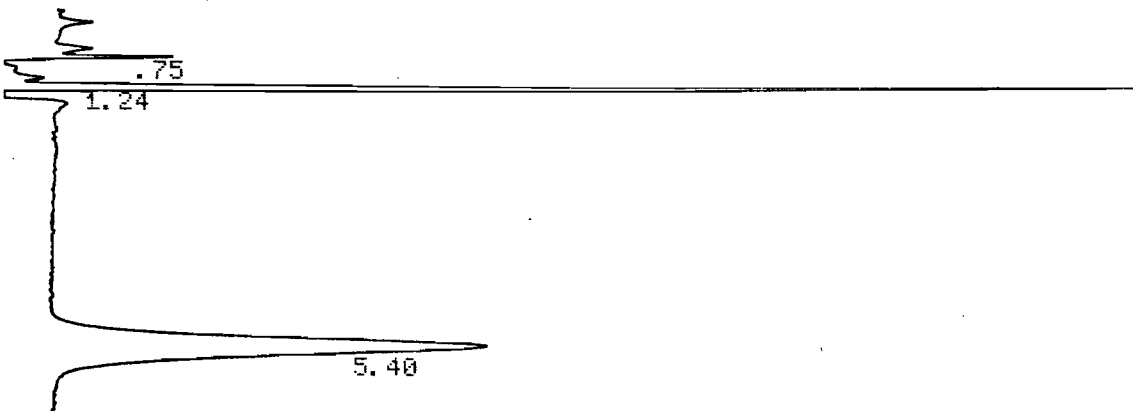
CHANNEL A INJECT 06/03/92 11:29:00



06/03/92 11:29:00 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	16	INDEX	16
PEAK#		AREA%	RT	AREA	BC		
1		2.116	0.75	4362	01		
2		46.532	1.25	95927	03		
3		51.352	5.41	105862	01	x	CF
TOTAL		100.		206151			

CHANNEL A INJECT 06/03/92 11:36:44



06/03/92 11:36:44 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	17	INDEX	17
PEAK#		AREA%	RT	AREA	BC		
1		2.472	0.75	5286	01		
2		45.921	1.24	98203	03		
3		51.607	5.4	110363	01	x	CF
TOTAL		100.		212852			

**Figure 10** : Chromatogrammes de la solution étalon 4 = 15 ug/ml

- Décongeler à température ambiante et broyer une quantité suffisante de muscle exempt de chloramphenicol.
- Peser quatre fractions de 5 g de broyat et les transférer dans quatre tubes à centrifuger de 15 ml.
- Ajouter à chaque tube 1 ml d'eau et 1 ml de l'une des solutions étalons n° 3, 4, 5 et 6 pour obtenir des échantillons de muscle supplémentés à 20, 15, 10 et 5 µg/kg.
- Boucher et agiter les tubes pendant 1 minute à vitesse maximum.
- Laisser en contact 15 minutes à température ambiante.
- Procéder pour chacun des tubes à l'extraction du chloramphenicol telle que décrite dans la partie extraction du chloramphenicol (page 62).

#### II.2.4.2.- Résultats

Le rendement d'extraction est calculée à partir des résultats obtenus avec les échantillons supplémentés. Il faut calculer ce rendement pour chaque concentration par la formule :

$$\frac{\text{Surface "Echan"}}{\text{Surface "Std"}} \times \frac{\text{Conc "std" x 0,7 x 6}}{\text{Conc "Echan" x 5 x 4,2}}$$

où le second facteur est égal à 1.

"Echan" = échantillon  
 "Std" = solution étalon correspondante  
 Conc = concentration

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 19.

Concentration des étalons en $\mu\text{g.ml}$	Nombre d'essais	Surface moyenne des pics $\text{uv.s}^{-1}$	Rendement Moyen %	Coefficient de variation %
N° 6 = 5 $\mu\text{g/kg}$	3	22659	86,5	2,7
N° 5 = 10 $\mu\text{g/kg}$	4	54390,5	84	3,1
N° 4 = 15 $\mu\text{g/kg}$	3	72335	85,5	2,8
N° 3 = 20 $\mu\text{g/kg}$	4	95114	85,1	3,1

Tableau 19 : Etude du taux de récupération ou rendement d'extraction du CAP

Le coefficient de variation ou CV s'obtient en exprimant l'écart-type en valeur relative ou en pour cent de la moyenne, lorsque celle-ci est positive.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} S = \text{écart - type} \\ \bar{X} = \text{Moyenne} \end{array}$$

On a un rendement global de 85,25 %, ce qui est acceptable.

#### II.2.5.- Validation de la méthode utilisée

- Il faut un temps de rétention du chloramphenicol comparable à celui de la méthode de référence (environ 6,6 mn). Notre étude nous a donné un temps de rétention de 6'64 minutes.

- Avec la courbe d'étalonnage, on a une linéarité de la réponse. La méthode de référence nous précise que la limite de détection quantitative est de 5  $\mu\text{g/kg}$  ; alors que celle qualitative est de 2  $\mu\text{g/kg}$ .

- Le rendement d'extraction moyen par la méthode de référence pour le muscle de veau pour la supplémentation à 10  $\mu\text{g/kg}$  est voisin de 82 %. Le rendement calculé dans notre laboratoire est de 85,25 %.

Avec ces résultats comparables à celle de la méthode de référence, nous pouvons dire que notre méthode est acceptable.

## CHAPITRE DEUXIEME : RESULTATS ET DISCUSSION

Les 100 ul du surnageant sont conservés dans des microtubes en plastique de type EPPENDORF. Ces extraits sont mis au réfrigérateur pendant toute la nuit, car l'analyse chromatographique se fait à partir de 8 heures. Chaque matin, l'appareil est calibré avec la phase mobile, car après chaque série d'échantillons, la colonne est lavée au méthanol. Le calibrage prend environ 1 heure. Les légères fluctuations observées avec le temps de rétention ne sont pas gênantes pour l'identification, car avant chaque passage d'échantillons, nous faisons passer d'abord les solutions étalons, puis les supplémentés. C'est en fonction de ces temps de rétention observés que l'on juge de la présence ou de l'absence de chloramphenicol.

### I - Résultats

#### I.1.- Résultats qualitatifs

Sur 200 échantillons analysés, nous avons eu 11 résultats positifs, uniquement chez les petits ruminants. Nous allons étudier ces résultats chez les petits ruminants et les bovins.

##### I.1.1.- Résultats chez les petits ruminants

Sur 100 échantillons, on a obtenu 11 résultats positifs. Ce ne sont que des mâles et tous les animaux positifs viennent de la région d'Abidjan. Le tableau 20 montre les résultats plus en détail.

	Nombre d'échantillons	Nombre de positifs	Pourcentage du positif %
Ovins	61	6	10
Caprins	39	5	12,8
Total	100	11	11

Tableau 20 : Résultats chez les petits ruminants selon l'espèce.

Le taux de positivité est de :

- 10 p. 100 pour les ovins (fig. 11) ;
- 12,8 p. 100 pour les caprins (fig.12) ;
- 11 p.100 au total (fig. 13).

Fig. 11: Pourcentage des ovins positifs

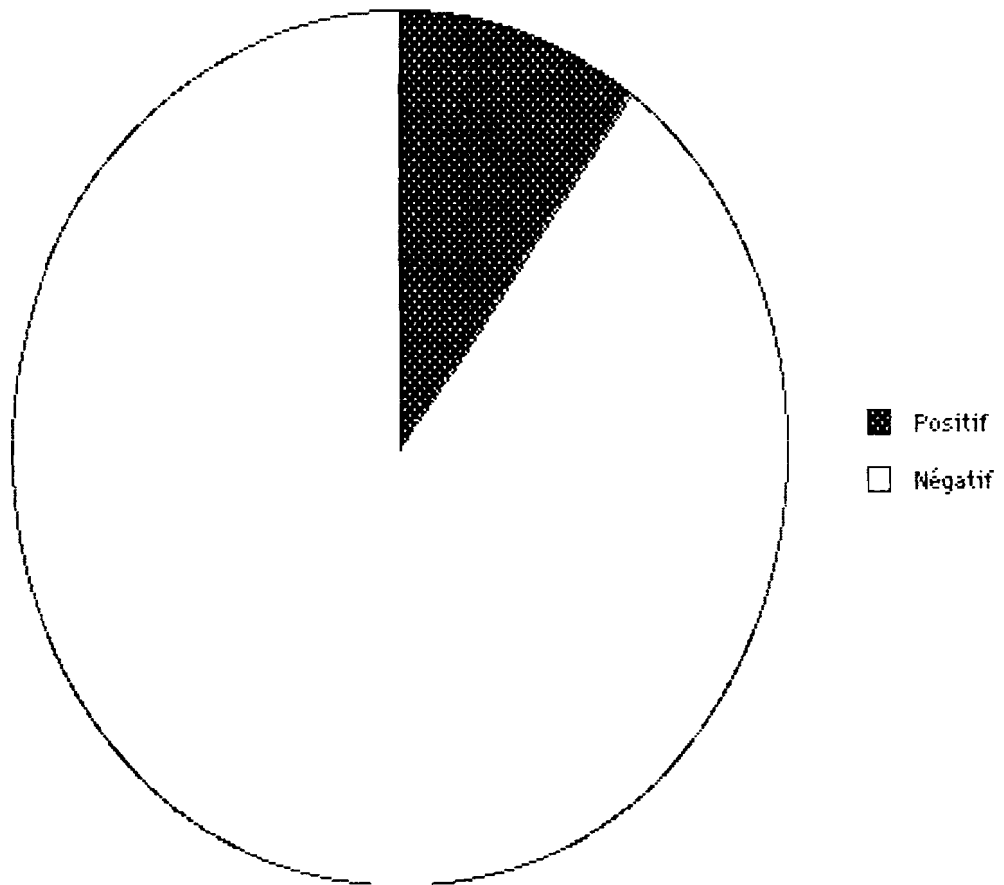


Fig. 12 : Pourcentage des caprins positifs

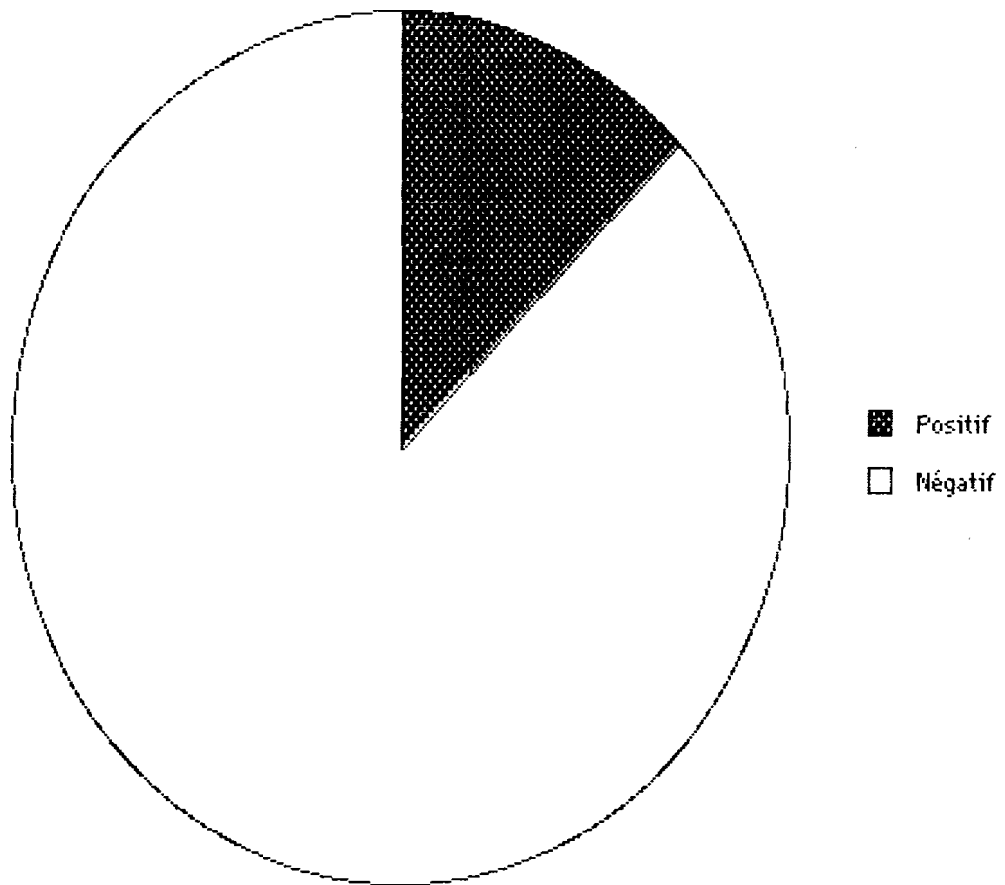
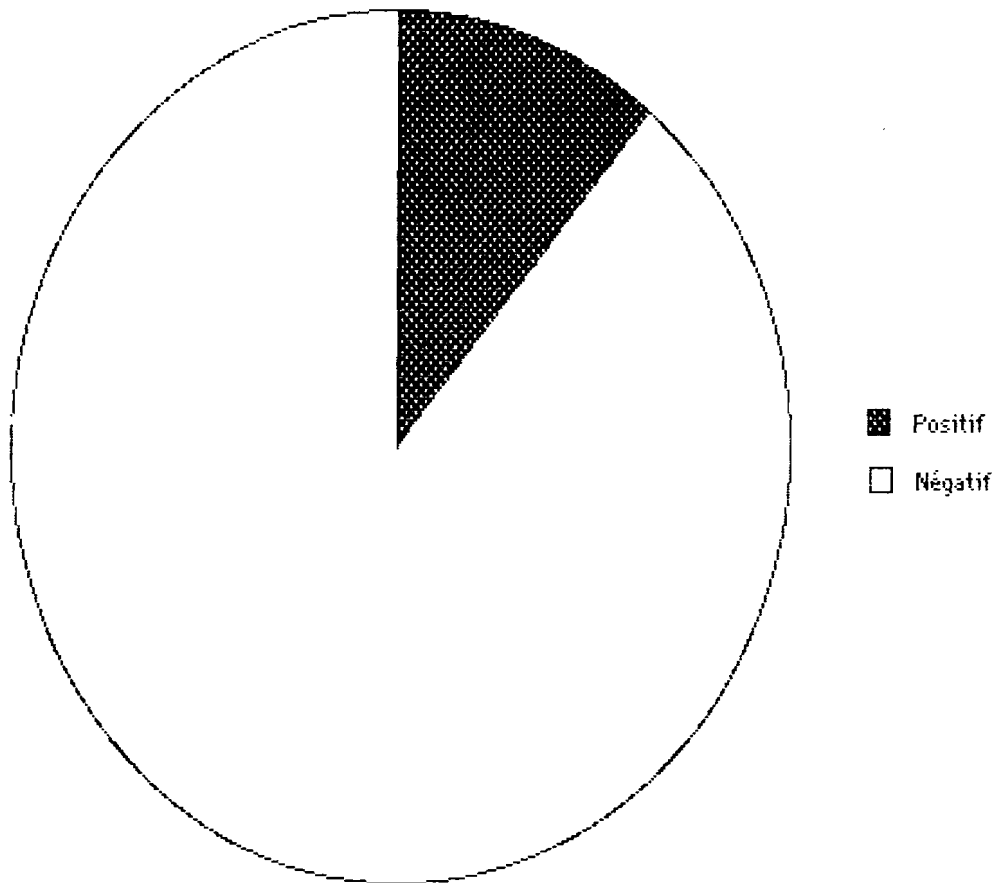




Fig. 13 : Pourcentage des petits ruminants positifs



### I.1.2.- Résultats chez les bovins

Sur 100 prélèvements, on a obtenu aucun résultat positif tant au niveau d'Abidjan, que de l'intérieur.

### I.2.- Résultats quantitatifs

La surface la plus élevée est de l'animal Ao 57 avec 19030 mv.s-1.

Pour calculer la concentration en chloramphenicol, nous avons tenu compte du rendement d'extraction. On a obtenu : la surface réelle de :

$$\frac{19030}{0,851} = 22.361 \text{ m.v.s}^{-1}$$

Cette valeur est inférieure à la surface donnée par la plus petite concentration = 5 µg/kg qui est de 26.473,5. Donc cette valeur n'est pas quantifiable. Il en est de même pour toutes les autres valeurs. Les résultats obtenus au niveau de notre manipulation sont uniquement qualitatifs, car compris entre 2 µg/kg et 5 µg/kg.

## II - Discussion

Le matériel et méthode utilisés ainsi que les résultats obtenus, nécessitent des commentaires.

### II.1.- Discussion du matériel

- Les Animaux : notre but était de travailler sur les volailles et les oeufs, mais des problèmes de prélèvements et de méthode d'extraction, ont fait que nous nous sommes cantonnés aux Ruminants (Bovins, ovins, caprins). Avec une production de viande faible :

- + 5620 tonnes carcasses pour les petits ruminants (1985) ;
- + 16570 tonnes carcasse pour les bovins (1985),

nous étions obligés d'arrêter le nombre d'échantillons à 100 pour les 2 groupes d'animaux.

Le choix du muscle a été imposé par la méthode. L'origine des animaux a été difficile à déterminer compte tenu du fait qu'il n'y a que les bouchers qui s'occupent des carcasses dans les abattoirs. Cela est dû au fait que les abattages se font entre 02h et 06h, car il n'y a pas de chambre froide dans les abattoirs visités.

- Matériel : la colonne a été utilisée sous précolonne. La boucle d'injection obtenue au LACENA était de 20 µl tandis que celle proposée par la méthode de référence en faisait 200 ; donc 10 fois plus. Pour obtenir des résultats identiques (concentration finale en chloramphenicol des échantillons), nous avons augmenté les concentrations des étalons de 10 fois.

## **II.2.- Discussion de la méthode**

L'extraction du chloramphenicol et l'analyse chromatographique ne se faisaient pas au même endroit.

La première manipulation se faisait de 14h à 19h car la méthode d'extraction n'est pas facile et même contraignante. La seconde, au LACENA de 8h à 12h.

## **II.3.- Discussion des résultats**

Sur les 200 échantillons analysés, nous avons eu 11 résultats positifs non quantifiables uniquement au niveau des petits ruminants (11 p.100). Il y a 6 ovins et 5 caprins.

L'origine des animaux étant difficile à déterminer, nous pensons que les 6 ovins positifs viennent d'une station d'élevage locale, car les 3/4 des animaux de l'abattoir d'Abidjan viennent des pays voisins (Mali, Burkina-Faso et Niger). Ces animaux venant de l'étranger, sont rarement traités, de même les animaux ne le sont pas au niveau du foirail.

Le problème devient plus complexe, quand il s'agit des caprins qui sont rarement traités dans nos pays car ces animaux sont reconnus pour leur solidité et leur rusticité. Lors de l'importation du bétail, les agents de l'élevage pratiquent au niveau des frontières, des

vaccinations et des traitements. C'est la seule hypothèse que nous ayons trouvée.

Pour les bovins, nous avons trouvé des résultats négatifs. Cela s'explique car lors de nos enquêtes sur le terrain, nous avons remarqué que la plupart des éleveurs utilisent la Tétracycline Longue Action (T.L.A.\*) d'abord : "c'est le traitement miracle" disent-ils.

En tous cas, pour les consommateurs que nous sommes, cela est réconfortant car la viande bovine est la plus consommée en Côte d'Ivoire. La viande des petits ruminants arrive en 7<sup>ème</sup> position après l'antilope et l'agouti (source Enquête consommation 1979-1984).

## CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la présence de résidus de chloramphenicol dans la viande consommée en Côte d'Ivoire.

En effet, le chloramphenicol est un antibiotique bactériostatique apparenté à la famille des Phénicolés, de structure chimique relativement simple, lui attribuant ces différentes propriétés. C'est un excellent antibiotique à large spectre et le premier mode d'action du chloramphenicol est une inhibition de la synthèse protéique. En se liant à la sous unité 50 S du ribosome bactérien 70 S, il bloque ainsi la formation de la liaison peptidique.

En Médecine Vétérinaire, son efficacité particulière sur les Salmonelles, coliformes, pasteurelles et son coût modéré, en font un antibactérien très utilisé.

Malgré tous ces avantages, il faut craindre sa toxicité (aplasie médullaire irréversible), l'accroissement de la résistance des bactéries et la présence de résidus de chloramphenicol dans les denrées alimentaires d'origine animale telles que la viande, les oeufs et le lait.

Avec tous ces problèmes, nous avons voulu savoir si la population ivoirienne était exposée au risque de la présence de résidus de cet antibactérien dans l'alimentation. Pour cela, nous avons fait 200 prélèvements de viandes, bovine, ovine et caprine dans trois régions peuplées de la Côte d'Ivoire, que nous avons analysés par une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance du Centre National d'Etudes Vétérinaires Alimentaires de France, adaptée à nos conditions.

Le temps de rétention moyen obtenu est de 6,64 mn et le rendement d'extraction de 85,25 %. Avec une méthode d'extraction très contraignante, le rendement peut considérablement varier, car au début de nos analyses, nous avons des rendements de 40 à 50 %.

Pour ce qui est des résultats obtenus, il y a eu 11 cas positifs, uniquement chez les petits ruminants ; soit un taux de positivité de 11 p. 100.

Les résultats se sont avérés négatifs pour les bovins. Face à ce risque toujours croissant de voir le problème des résidus prendre de l'ampleur dans nos pays, nous préconisons la sensibilisation des agents d'élevage et des éleveurs sur la nécessité du respect du délai d'attente d'une part et d'autre part, l'ouverture d'un abattoir sanitaire et le fonctionnement des laboratoires ou centres de contrôle au niveau des abattoirs, qui seront chargés de contrôler la présence de résidus d'antibiotiques et de pesticides dans les viandes.

Comme dans certains pays, nous pouvons mettre au point une méthode microbiologique de routine, pour les animaux suspects.

Nous insistons sur le fait qu'il faut des échanges et des contacts entre les Vétérinaires, Pharmaciens, Médecins, Hygiénistes pour pouvoir maîtriser tous les problèmes relatifs à la santé animale comme humaine. Enfin, il serait intéressant de faire une étude sur les volailles, les porcins et les oeufs et surtout continuer l'enquête faite au niveau des ruminants pour avoir des données sur l'ensemble de nos denrées alimentaires d'origine animale.

**BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - **ARNOLD, D. SOMOGYI, A.**  
Zum Nachweis von chloramphenicol - Rückstanden  
Dtsh. Veterinaarmed Geselle, 1982 : 206-212.
- 2 - **BERGT, G. STOWE, C.M.**  
Comparison of bioavailability of two chloramphenicol  
preparations in dogs after intramuscular injection.  
Am. J. Vet. Res. 1975, 36 : 1481-1482.
- 3 - **BEST. WILLIAM, R.**  
Chloramphenicol - Associated blood dyscresias.  
J. Am. Med. Ass. 1967, 201/3 : 99-106.
- 4 - **BINET, M.V.**  
Les résidus de chloramphenicol dans les données d'origine  
animales.  
Thèse Méd. Vét. : Alfort : 1976 ; 21.
- 5 - **BRETON, J.**  
Contribution à l'étude des effets hematologiques et biochimiques  
du chloramphenicol chez le chat.  
Thèse. Méd. Vét. : Toulouse : 1983 ; 76.
- 6 - **CLARENBURG, R. RAO, V.R.**  
A fluorometric method to assay chloramphenicol.  
Drug. Metabo. dispos. 1977, 5 : 246-252.
- 7 - **DECLOITRE, F. FRAYSINET, C.**  
Study project on the cellular effect of chloramphenicol and its  
metabolites.  
Paris : Institut de recherche scientifique sur le cancer, Sd.
- 8 - **DENIER, T.**  
Etude des résidus d'antibactériens dans les poissons.  
Thèse Méd. Vét. : ALfort : 1991 ; 35.

- 9 - **ELRICH, J. BARTZ, Q.R. SMITH, R.M. et co**  
Chloromycetin, a new antibiotique from a soil actinomycete.  
Science, 1947, 106.- 417.
- 10 - **FABIANSSON, S. NILSSON, R. BACKSTROM, J.**  
Tissue concentrations of chloramphenicol after intramuscular injection in pigs.  
J. Sci. Food. Agric, 1976, 27 : 1156-1162.
- 11 - **FIDES**  
Société Fiduciaire.  
CH - 8027 Zurich, Mai 1987.
- 12 - **GLASKO, A.J. WOLF, L.M. DILL, W.A. BRATTON, Ac. Jr.**  
Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin) II.  
Tissues distribution and excretion studies.  
J. Pharmacol. Exper. therap, 1949, 96 : 445-459.
- 13 - **GOUNELLE, H.**  
Antibiotiques et alimentation : sur l'opportunité de formuler plus clairement certains principes.  
Bull. Acad. Nat. Med, 1965, 149 : 132.
- 14 - **HÄSLER, St**  
Chloramphenicol : Point de vue et réglementation en Suisse.  
Ann. Rech. Vet, 1985, 16 (2) : 163-164.
- 15 - **HIRSH. DWIGHT, C. INDIUERI. MARY, C. IAN, G. et co.**  
Changes in prevalence and susceptibility of obligate anaerobies in clinical veterinary pratice.  
J. AVMA, 1985, 186 (10) : 1086-1089.
- 16 - **LASERRE, J.**  
Recherche du chloramphenicol utilisé en pisciculture dans les différents tissus de la truite arc en ciel (Salmogardneri richardson). Conséquences thérapeutiques et sanitaires.  
Thèse Méd. Vét. : ALfort : 1972 ; 79.



- 17 - LIBEAU, V.**  
Les résidus de chloramphenicol : leur dosage dans le lait par HPLC.  
DEA : Toxicologie fondamentale et appliquée à l'environnement et  
aux industries pharmaceutiques et agro-alimentaires.  
Paris : 1985.
- 18 - MEYLER, L. POLACK, B.C.P. SHUT, D. WESSELING**  
Blood dyscrasias attributed to chloramphenicol.  
Post graduate Medical Journal, 1974, 50 : 123-166.
- 19 - MILHAUD, G.**  
Les résidus de chloramphenicol et leur toxicité.  
Ann. rech. Vet. 1985, 16 : 133-148.
- 20 - MOUILLET, L. LUQUET, F.M.**  
Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-  
alimentaires.  
Paris : Technique et doc : APRIA, 1980, vol. 4.- 435 p.
- 21 - NEUMAN, J.**  
Vade. Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques  
antiinfectieux.  
4 ed.- Paris : Maloin, 1979.- 679 p.
- 22 - NOUWS, F.M. ZIV, G.**  
A study of chloramphenicol distribution and residues in dairy  
cows.  
Tijdschr. Diergeneesk, 1978, 103 : 725-735.
- 23 - NOUWS, J.F.M.**  
Tolerance and detection of continental residues in slaughtered  
animales.  
Archib Lebensmittel hyg, 1981, 32 : 97-140.
- 24 - PILLOUD, M.**  
Pharmacokinetics plasma protein binding and dosage of  
chloramphenicol in cattle and horses.  
Res. Vet. Sci, 1973, 15 ; 231-238.

- 25 - **PILLOUD, M.**  
Pharmacocinétique, liaison aux protéines et dosage  
d'oxytétracycline et du chloramphenicol chez le cheval et la vache.  
Diss. Bern, 1972.
- 26 - **PILLOUD, M.**  
Antibiotiques et chimiothérapiques. De la recherche à la pratique.  
Schweiz. arch., Tierheilk, 1982, 124 . : 121-399.
- 27 - **RELSTOCK., CROOKS., CONTROULIS., BARTZ et co.**  
Chloramphenicol (chloromycetin).  
IV. chemical studies.  
J. AM. Chem. soc. 1949, 71 : 2458-2468.
- 28 - **RUCKBUSH. V.**  
Incompatibilités médicamenteuses.  
Dictionnaire des Médicaments vétérinaires.  
Paris : Ed point Vét. 1979.- 345 p.
- 29 - **SCOTT, J.L. FINEGOLA, S.M. BELKIN, G.M. et co.**  
A controlled double blind study of the hematologic toxicity of  
chloramphenicol.  
New. Engl. J. Med. 1965, 272 : 1137.
- 30 - **SISODIA, C.S. DUNLOP, R.H.**  
Chloramphenicol residues in tissues of boiler chicken.  
Can. Vet. J. 1972a, 13 : 263-265.
- 31 - **SISODIA, C.S. DUNLOP, R.H.**  
Chloramphenicol residue in eggs.  
Can. Vet. J. 1972b, 13 : 279-282.
- 32 - **TAO, SH. POUMEYROL, M.**  
Méthodes de détection des antibiotiques dans les viandes par  
électrophorese.  
Rec. Méd. Vét. 1985, 161 : 457-463.

- 33 - VAN DER LEE, J.J. NOUWS, J.F.M. BLOEMENDAL, F.W.R.**  
Physiochemical methods for pharmacokinetics and residus analysis of chloramphenicol and degradation product in dary cow.  
J. Vet. Pharmacol. ther, 1982, 5 : 161-175.
- 34 - VINCENT. PAUL, C.**  
Drug induced aplastic anaemia and agranulocytosis incidence and mechanisms.  
Drug, 1986, 31 : 52-63.
- 35 - WALL, J.M. PELERAN, J.C. BOIRIES, G.F.**  
High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk.  
J. Assoc. off. Anal. chem : 1980, 63 : 1044-1048.
- 36 - YEMADJE, P.**  
Dosage du chloramphenicol par la voie microbiologique.  
Application à la détermination des concentrations plasmatiques chez le mouton.  
Thèse Méd. Vét. : Dakar : 1985 ; 14.
- 37 - ZIV, G. GORDIN, S. BACHAR, G. BERNSTEIN. S.**  
Concentration and persistence of antibiotics in milk following intramammary infusion in cows.  
Refuah Vet. 193, 30 : 85-100.

# ANNEXES

# **ANNEXE 1**

## **FICHE RESULTATS : PETITS RUMINANTS**

## FICHE RESULTATS : PETITS RUMINANTS

*Surfale*      *toys*  
*di robot*

N° série	N° Echantillon	Espèces	Sexe	Provenance	R* H.P.L.C.
1	Ao 52	Caprine	Mâle	Abidjan	12 637 (6'52)
2	Ao 63	Ovine	"	ABJ	( - )
3	Ao 55	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
4	Ao 74	Caprine	Mâle	ABJ	( - )
5	Ao 65	Ovine	Femelle	ABJ	
6	Ao 66	Ovine	Mâle	ABJ	11 610 (6'28)
7	Ao 51	Caprine	"	ABJ	( - )
8	Ao 57	Caprine	"	ABJ	19 030 (6'28)
9	Ao 62	Ovine	"	ABJ	8033 (6'28)
10	Ao 73	Ovine	Femelle	ABJ	22 683 (6')
11	Ao 67	Caprine	Mâle	ABJ	( - )
12	Ao 59	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
13	Ao 64	Ovine	"	ABJ	( - )
14	Ao 56	Caprine	Mâle	ABJ	( - )
15	Ao 53	Caprine	"	ABJ	( - )
16	Ao 70	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
17	Ao 54	Caprine	Mâle	ABJ	( - )
18	Ao 75	Caprine	"	ABJ	13 438 (6'3)
19	Ao 60	Ovine	"	ABJ	( - )

N° série	N° Echantillon	Espèces	Sexe	Provenance	R* H.P.L.C.
20	Ao 71	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
21	Ao 72	Ovine	"	ABJ	( - )
22	Ao 68	Ovine	"	ABJ	( - )
23	Ao 34	Ovine	"	ABJ	( - )
24	Ao 09	Caprine	Femelle	ABJ	( - )
25	Ao 04	Ovine	Mâle	ABJ	5068 (6'24)
26	Ao 29	Ovine	"	ABJ	6608 (6'25)
27	Ao 47	Ovine	"	ABJ	4865(6'21)
28	Ao 30	Ovine	"	ABJ	5730 (6'2)
29	Ao 16	Caprine	"	ABJ	( - )
30	Ao 37	Ovine	"	ABJ	( - )
31	Ao 41	Ovine	"	ABJ	( - )
32	Ao 05	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
33	Ao 58	Ovine	"	ABJ	( - )
34	Ao 12	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
35	Ao 33	Ovine	"	ABJ	10 338 (6'89)
36	Ao 35	Caprine	"	ABJ	( - )
37	Ao 17	Ovine	"	ABJ	( - )
38	Ao 10	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
39	Ao 69	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
40	Ao 08	Ovine	"	ABJ	( - )
41	Ao 07	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
42	Ao 03	Ovine	"	ABJ	( - )
43	Ao 21	Caprine	Mâle	ABJ	( - )

## PETITS RUMINANTS

N° série	N° Echantillon	Espèces	Sexe	Provenance	R* H.P.L.C.
44	Ao 22	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
45	Ao 61	Caprine	"	ABJ	( - )
46	Ao 42	Ovine	"	ABJ	( - )
47	Ao 38	Caprine	"	ABJ	( - )
48	Ao 13	Caprine	"	ABJ	4293 (6'3)
49	Ao 39	Ovine	"	ABJ	( - )
50	Ao 14	Ovine	"	ABJ	( - )
51	Ao 40	Caprine	"	ABJ	( - )
52	Ao 15	Ovine	"	ABJ	( - )
53	Ao 36	Caprine	"	ABJ	( - )
54	Ao 11	Caprine	"	ABJ	( - )
55	Ao 44	Caprine	"	ABJ	( - )
56	Ao 19	Ovine	"	ABJ	( - )
57	Ao 43	Ovine	"	ABJ	( - )
58	Ao 18	Caprine	"	ABJ	( - )
59	Ao 28	Caprine	"	ABJ	8617 (6'6)
60	Ao 03	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
61	Ao 26	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
62	Ao 01	Caprine	Femelle	ABJ	( - )



N° série	N° Echantillon	Espèces	Sexe	Provenance	R* H.P.L.C.
63	Ao 32	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
64	Ao 07	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
65	Ao 17	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
66	Ao 02	Ovine	"	ABJ	( - )
67	Ao 06	Ovine	"	ABJ	( - )
68	Ao 27	Ovine	"	ABJ	( - )
69	Ao 31	Ovine	"	ABJ	( - )
70	Ao 23	Ovine	"	ABJ	( - )
71	Ao 48	Ovine	"	ABJ	( - )
72	Ao 24	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
73	Ao 49	Caprine	Mâle	ABJ	( - )
74	Ao 25	Ovine	Femelle	ABJ	( - )
75	Ao 50	Ovine	Mâle	ABJ	( - )
76	B 22	Caprine	Mâle	C I	( - )
77	B 11	Caprine	"	Mali	( - )
78	B 10	Ovine	Femelle	C I	( - )
79	B 15	Ovine	Mâle	Mali	( - )
80	B 14	Ovine	"	C I	( - )
81	B 06	Caprine	Femelle	C I	( - )
82	B 05	Caprine	"	C I	( - )
83	B 17	Ovine	"	C i	( - )

N° série	N° Echantillon	Espèces	Sexe	Provenance	R* H.P.L.C.
84	B 16	Caprine	Femelle	C I	( - )
85	B 13	Ovine	"	C I	( - )
86	B 12	Caprine	Mâle	Mali	( - )
87	B 09	Caprine	Femelle	C I	( - )
88	B 08	Caprine	Mâle	Mali	( - )
89	B 21	Caprine	"	C I	( - )
90	B 20	Ovine	Femelle	C I	( - )
91	B 04	Ovine	Mâle	C I	( - )
92	B 03	Ovine	Femelle	C I	( - )
93	B 02	Caprine	Mâle	C I	( - )
94	B 01	Caprine	"	C I	( - )
95	B 19	Ovine	Femelle	C I	( - )
96	B 18	Caprine	Mâle	C I	( - )
97	B 07	Caprine	Femelle	Mali	( - )
98	B 24	Ovine	Mâle	C I	( - )
99	B 23	Caprine	"	C I	( - )<
100	B 25	Ovine	"	C I	( - )

# **ANNEXE 2**

**FICHE RESULTATS : BOVINS**

## FICHE RESULTATS : BOVINS

N° Echantillon	Race	Sexe	Provenance	R* HJ.P.L.C.
KB 01 (Korhogo)	Zébu	Femelle	Korhogo	( - )
KB 02	"	Mâle	"	( - )
KB 03	"	"	"	( - )
KB 04	"	Femelle	"	( - )
KB 05	Taurine	"	"	( - )
KB 06	"	Mâle	"	( - )
KB 07	"	Femelle	"	( - )
KB 08	Zébu	Mâle	"	( - )
KB 09	Taurine	"	"	( - )
KB 10	"	Femelle	"	( - )
KB 11	"	Mâle	"	( - )
KB 12	"	Femelle	"	( - )
KB 13	"	"	"	( - )
KB 14	"	Mâle	"	( - )
KB 15	"	"	"	( - )
KB 16	"	Femelle	"	( - )
KB 17	"	"	"	( - )
KB 18	"	"	"	( - )
KB 19	"	"	"	( - )
KB 20	"	Mâle	"	( - )
KB 21	"	"	"	( - )
KB 22	"	Femelle	"	( - )
KB 23	"	Mâle	"	( - )
KB 24	"	Femelle	"	( - )
KB 25	"	Mâle	"	( - )

N° Echantillon	Race	Sexe	Provenance	R* HJ.P.L.C.
BB 01 (Bouaké)	Taurine	Mâle	CI	( - )
BB 02	"	Femelle	Mali	( - )
BB 03	"	Mâle	CI	( - )
BB 04	Zébu	Femelle	Mali	( - )
BB 05	"	"	Burkina Faso	( - )
BB 06	"	Mâle	Mali	( - )
BB 07	Taurine	Femelle	CI	( - )
BB 08	Zébu	Mâle	Burkina Faso	( - )
BB 09	"	Femelle	Mali	( - )
BB 10	"	Mâle	Mali	( - )
BB 11	"	"	CI	( - )
BB 12	"	"	Mali	( - )
BB 13	"	"	Burkina Faso	( - )
BB 14	"	"	Mali	( - )
BB 15	"	"	Burkina Faso	( - )
BB 16	"	"	Mali	( - )
BB 17	"	"	Burkina Faso	( - )
BB 18	"	"	Mali	( - )
BB 19	"	Femelle	Burkina Faso	( - )
BB 20	"	Mâle	Burkina Faso	( - )
BB 21	"	"	Mali	( - )
BB 22	"	Femelle	CI	( - )
BB 23	"	Mâle	Mali	( - )
BB 24	"	"	Burkina Faso	( - )
BB 25	"	"	mali	( - )

N° Echantillon	Race	Sexe	Provenance	R* HJ.P.L.C.
Abidjan = Abattoir	Zébu	Mâle	Abidjan	( - )
AB 01	"	"	"	( - )
AB 02	"	"	"	( - )
AB 03	"	"	"	( - )
AB 04	"	"	"	( - )
AB 05	"	"	"	( - )
AB 06	"	"	"	( - )
AB 07	"	"	"	( - )
AB 08	"	"	"	( - )
AB 09	"	"	"	( - )
AB 10	"	"	"	( - )
AB 11	"	"	"	( - )
AB 12	Taurine	"	"	( - )
AB 13	Zébu	"	"	( - )
AB 14	Taurine	"	"	( - )
AB 15	Zébu	Femelle	"	( - )
AB 16	"	Mâle	"	( - )
AB 17	Taurine	"	"	( - )
AB 18	Zébu	"	"	( - )
AB 19	"	"	"	( - )
AB 20	Taurine	Femelle	"	( - )
AB 21	"	Mâle	"	( - )
AB 22	Zébu	"	"	( - )
AB 23	Taurine	"	"	( - )
AB 24	"	Femelle	"	( - )
AB 25	"	Mâle	"	( - )

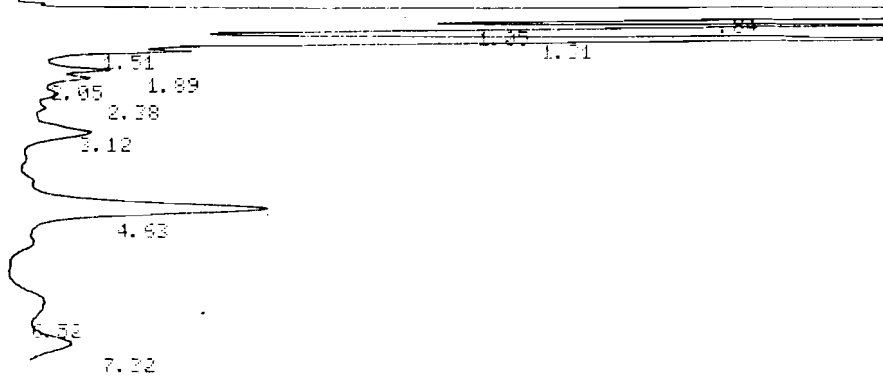
N° Echantillon	Race	Sexe	Provenance	R* HJ.P.L.C.
L.G.A. (Abidjan)	Taurine	Mâle	France	( - )
BI 01	"	"	"	( - )
BI 02	"	"	"	( - )
BI 03	"	"	"	( - )
BI 04	"	"	"	( - )
BI 05	"	"	"	( - )
BI 06	"	"	"	( - )
BI 07	"	"	"	( - )
BI 08	"	"	"	( - )
BI 09	"	"	"	( - )
BI 10	"	"	"	( - )
BI 11	"	"	"	( - )
BI 12	"	"	"	( - )
BI 13	"	"	"	( - )
BI 14	"	"	"	( - )
BI 15	"	"	"	( - )
BI 16	"	"	"	( - )
BI 17	"	"	"	( - )
BI 18	"	"	"	( - )
BI 19	"	"	"	( - )
BI 20	"	"	"	( - )
BI 21	"	"	"	( - )
BI 22	"	"	"	( - )
BI 23	"	"	"	( - )
BI 24	"	"	"	( - )
BI 25	"	"	"	( - )

# **ANNEXE 3**

## **CHROMATOGRAMMES D'ECHANTILLONS POSITIFS**



CHANNEL A INJECT 04/08/92 10:30:19



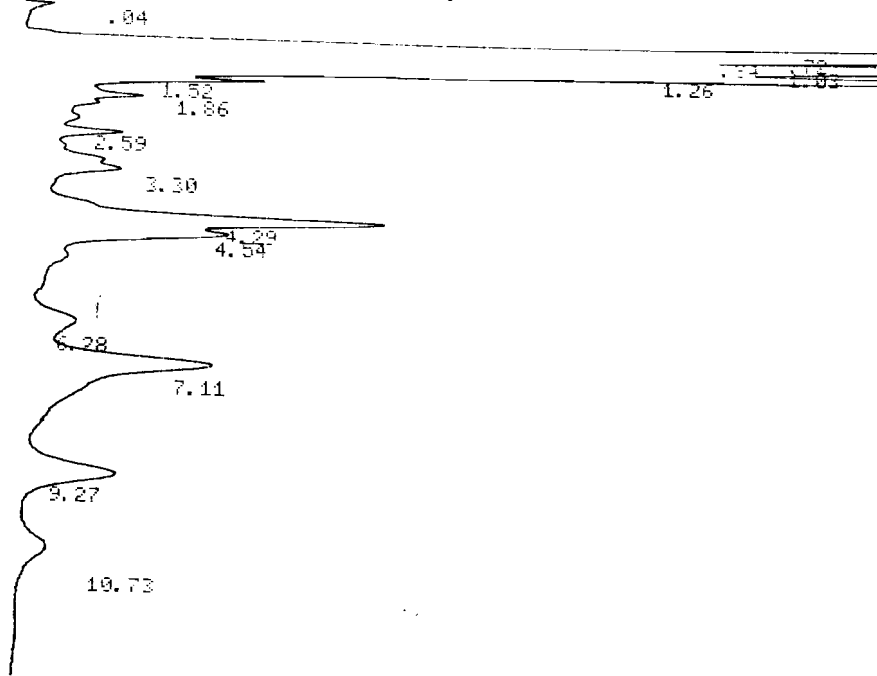
04/08/92 10:30:19 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 7 INDEX 7

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	58.288	0.84	539569 02
2	11.384	1.35	105273 02
3	16.227	1.31	151143 02
4	1.319	1.51	12208 03
5	0.763	1.89	7115 02
6	0.546	2.05	5056 02
7	0.165	2.38	1531 03
8	1.521	3.12	14084 01
9	7.515	4.63	69569 01
10	1.365	6.52	12927 02
11	0.2	7.32	7410 03

TOTAL 100. 925700

CHANNEL A INJECT 04/08/92 11:48:48



04/08/92 11:48:48 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 15 INDEX 15

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.173	0.84	2521 01
2	12.478	0.72	181799 02
3	14.844	0.94	204608 02
4	35.159	1.03	512234 02
5	14.648	1.26	213411 02
6	1.098	1.52	15990 03
7	0.253	1.86	3679 01
8	0.491	2.59	7157 01
9	1.264	3.3	18414 01
10	5.945	4.29	86607 02
11	2.184	4.54	31813 03
12	1.306	6.28	19030 02
13	7.167	7.11	104419 03
14	2.727	9.27	39735 01
15	1.062	10.73	15484 01

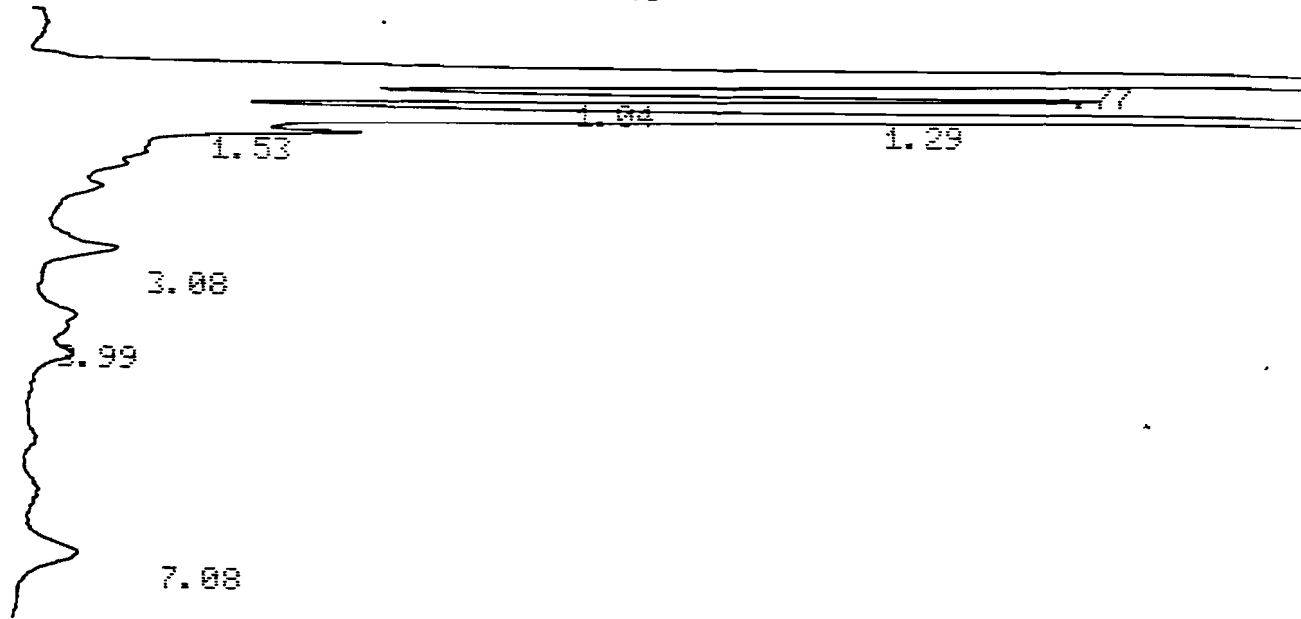
TOTAL 100. 1000000

# **ANNEXE 4**

## **CHROMATOGRAMMES D'ECHANTILLONS NEGATIFS**

Ac

CHANNEL A INJECT 04/08/92 11:36:48



04/08/92 11:36:48 CH= "A" PS= 1.

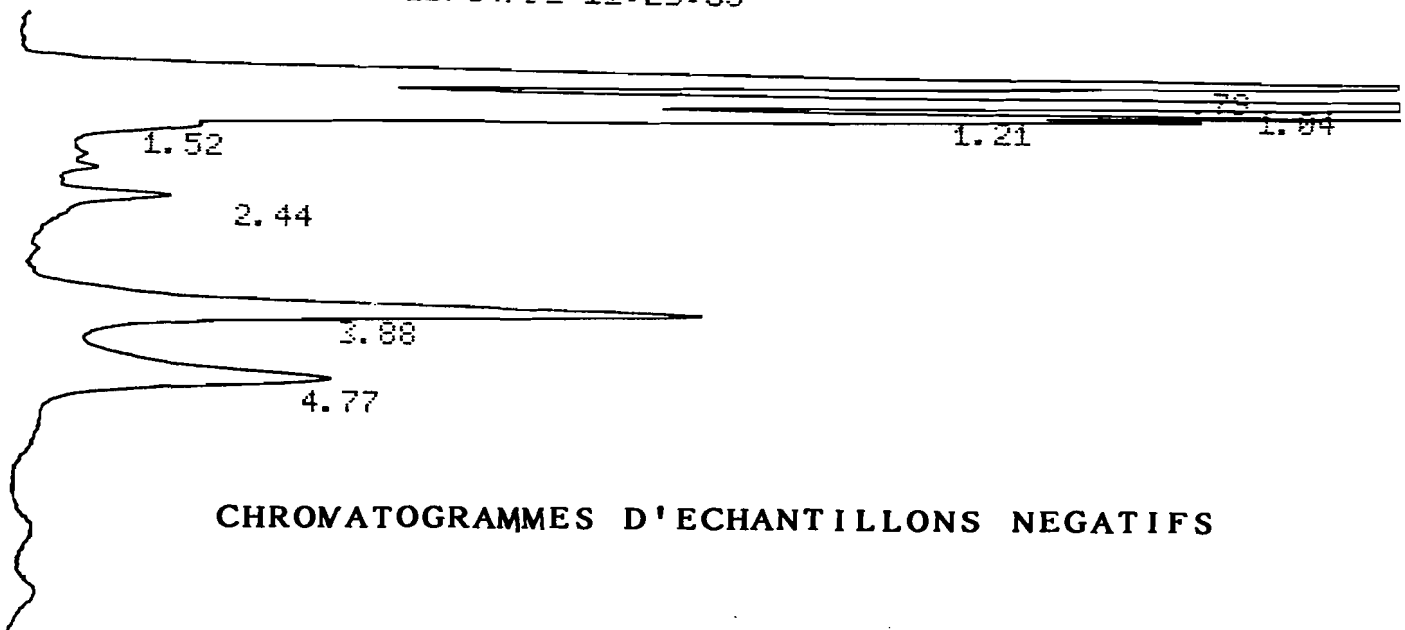
FILE 1. METHOD 0. RUN 14 INDEX 14

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	46.082	0.77	257967	02
2	13.556	1.04	75886	02
3	31.495	1.29	176309	02
4	2.367	1.53	13250	03
5	1.827	3.08	10229	01
6	2.893	3.99	16197	01
7	1.78	7.08	9966	01

TOTAL 100. 559804

Ad 08

CHANNEL A INJECT 13/04/92 11:23:55



CHROMATOGRAMMES D'ECHANTILLONS NEGATIFS

8.17

# **ANNEXE 5**

**METHODE H.P.L.C. DE REFERENCE**

**(C.N.E.V.A. (L.M.V.) Septembre 1990)**

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET

**CNEVA**

CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES

LABORATOIRE DES MEDICAMENTS VETERINAIRES

(Unité de Recherches : Contaminants médicamenteux)

JAVENE - 35133 FOUGERES

Tél. 99 99 32 34

Telefax 99 99 37 91

Télex LMV 741909 F

Document UCM/90/02  
Responsable : B. Roudaut

Septembre 1990

## METHODE DE DOSAGE DU CHLORAMPHENICOL DANS LE MUSCLE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION

### 1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode a pour objet la mise en évidence et le dosage éventuel des résidus de chloramphénicol dans le muscle des animaux de boucherie, et principalement le muscle de veau.

Elle est applicable à des échantillons congelés à une température de -20°C environ aussitôt après le prélèvement, et conservés à cette température jusqu'au moment de l'analyse.

La concentration minimale quantifiable est de 5 µg/Kg.

### 2 - PRINCIPE

Après broyage de l'échantillon, le chloramphénicol est extrait par l'acétate d'éthyle, puis repris, après évaporation à sec, par un mélange de solvants organiques et d'eau. La phase aqueuse est soumise à l'analyse chromatographique sur une colonne à phase greffée apolaire, type C18, avec détection photométrique dans l'U.V. à 278 nm.

### 3 - MATERIEL

#### 3.1 - Verrerie

3.1.1 - Tubes à centrifuger de 15 ml en verre à col rodé

3.1.2 - Tubes à centrifuger de 5 ml

3.1.3 - Ballons de 20 ml à col rodé

3.1.4 - Pipettes de précision graduées, de 10 ml, 5 ml, 1 ml

3.1.5 - Fioles jaugées de 50 et 100 ml à col rodé

3.1.6 - Bouchons en polyéthylène ou P.T.F.E. adaptables à la verrerie à col rodé

### 3.2 - Autres matériels

- 3.2.1 - Agitateur électrique pour tubes à essais, type VORTEX
- 3.2.2 - Evaporateur rotatif, type BUCHI, Rotavapor RE 120
- 3.2.3 - Centrifugeuse réfrigérée, type JOUAN GR 4.11, réglée à 20°C
- 3.2.4 - Agitateur rotateur, type HEIDOLPH, Réax 2
- 3.2.5 - Hachoir électrique, type MOULINEX, Moulinette
- 3.2.6 - Balance de précision, type SARTORIUS A 120 S
- 3.2.7 - Ensemble de chromatographie liquide à haute pression comprenant :
  - 3.2.7.1 - Pompe H.P.L.C., type VARIAN 5500
  - 3.2.7.2 - Détecteur U.V., type VARIAN UV 200
  - 3.2.7.3 - Calculateur-intégrateur, type VARIAN Vista 402
  - 3.2.7.4 - Injecteur avec boucle de 200 µl, type RHEODYNE 7125
  - 3.2.7.5 - Colonne à phase greffée en C18, de 15 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne, type WATERS Novapack C18, avec précolonne, type MERCK C18 4 x 4
  - 3.2.7.6 - Seringue en verre de 0,5 ml pour chromatographie, type HAMILTON

### 4 - REACTIFS

- 4.1 - Acétate d'éthyle pour analyses (MERCK 9623), distillé à l'évaporateur rotatif avant l'emploi
- 4.2 - Chloroforme pour analyses (MERCK 2445)
- 4.3 - Hexane pour analyses (MERCK 4367)
- 4.4 - Méthanol pour analyses (MERCK 6009)
- 4.5 - Eau "ultrapure" (MILLIPORE, système Milli-Q)
- 4.6 - Acétronitrile pour la chromatographie (MERCK 14291)
- 4.7 - Hydrogénophosphate de di-ammonium pour analyses (MERCK 1207)
- 4.8 - Chloramphénicol, de titre supérieur à 98 %
- 4.9 - Echantillons de muscle exempt de chloramphénicol, conservés à -20°C.

## **5 - MODE OPERATOIRE**

### **5.1 - Préparation des solutions étalons de chloramphénicol**

#### **5.1.1 - Solution n°1 à 500 µg/ml :**

Peser une quantité de chloramphénicol (4.8) correspondant à 50 mg de matière active dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 2 ml de méthanol (4.4) et dissoudre le chloramphénicol par agitation douce. Compléter à 100 ml avec de l'eau (4.5). Cette solution se conserve deux semaines à 4°C.

#### **5.1.2 - Solution n°2 à 5 µg/ml :**

Prélever 1 ml de la solution n°1 dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

#### **5.1.3 - Solution n°3 à 100 ng/ml :**

Prélever 1 ml de la solution n°2 dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter à 50 ml avec de l'eau.

#### **5.1.4 - Solution n°4 à 75 ng/ml :**

Prélever 0,75 ml de la solution n°2 dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter à 50 ml avec de l'eau.

#### **5.1.5 - Solution n°5 à 50 ng/ml :**

Prélever 1 ml de la solution n°2 dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

#### **5.1.6 - Solution n°6 à 25 ng/ml :**

Prélever 0,5 ml de la solution n°2 dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

### **5.2 - Extraction du chloramphénicol**

5.2.1 - Décongeler l'échantillon à température ambiante

5.2.2 - Broyer au hachoir (3.2.5)

5.2.3 - Peser (3.2.6) 5 g de broyat et les transférer dans un tube à centrifuger de 15 ml (3.1.1)

5.2.4 - Ajouter (3.1.4) 2 ml d'eau (4.5) et boucher (3.1.6)

5.2.5 - Agiter (3.2.1) 1 minute à vitesse maximum

5.2.6 - Ajouter (3.1.4) 6 ml d'acétate d'éthyle (4.1) et boucher le tube avec le même bouchon (5.2.4)

5.2.7 - Agiter (3.2.1) 1 minute à vitesse maximum

5.2.8 - Laisser reposer 10 minutes

5.2.9 - Agiter (3.2.1) 1 minute à vitesse maximum

5.2.10 - Centrifuger (3.2.3) 5 minutes à 4000 g

NB : On observe 3 phases :  
au fond : un résidu solide  
au milieu : une phase aqueuse  
au-dessus : une phase organique

5.2.11 - Prélever (3.1.4) 4,2 ml de la phase organique

5.2.12 - Transférer dans un ballon (3.1.3)

5.2.13 - Evaporer à sec (3.2.2) à 30°C environ

NB : S'assurer qu'il ne reste plus d'acétate d'éthyle, mais seulement un résidu huileux

5.2.14 - Reprendre (3.1.4) le résidu par 1,4 ml d'un mélange hexane (4.3) - chloroforme (4.2) 1:1, V/V

5.2.15 - Ajouter (3.1.4) 0,7 ml d'eau (4.5) et boucher le ballon (3.1.6)

5.2.16 - Agiter (3.2.4) pendant 5 minutes à 35 tours/minute

5.2.17 - Transvaser le contenu du ballon dans un tube (3.1.2)

5.2.18 - Centrifuger (3.2.3) 10 minutes à 4000 g

NB : Recommencer la centrifugation si la séparation des deux phases est jugée incomplète

5.2.19 - Prélever (3.2.7.6) une quantité suffisante de surnageant, supérieure à 200 µl et injecter dans le système chromatographique (3.2.7.4)

### 5.3 - Supplémentation

5.3.1 - Décongeler à température ambiante et broyer (3.2.5) une quantité suffisante de muscle exempt de chloramphénicol (4.9)

5.3.2 - Peser (3.2.6) quatre fractions de 5 g de broyat et les transférer dans quatre tubes à centrifuger de 15 ml (3.1.1)

5.3.3 - Ajouter (3.1.4) à chaque tube 1 ml d'eau (4.5) et 1 ml de l'une des solutions étalons n° 3, 4, 5, et 6 (5.1.3 à 5.1.6) pour obtenir des échantillons de muscle supplémentés à 20, 15, 10, et 5 µg/Kg.

5.3.4 - Boucher (3.1.6) et agiter (3.2.1) les tubes 1 minute à vitesse maximum.

5.3.5 - Laisser en contact 15 minutes à température ambiante

5.3.6 - Procéder pour chacun des tubes à l'extraction du chloramphénicol telle que décrite à partir du paragraphe 5.2.6

### 5.4 - Dosage chromatographique

5.4.1 - Composition de la phase mobile :

- acétonitrile 21 %  
- tampon ammonium (pH 7,9) 79 %

NB : Le tampon ammonium est préparé par dissolution de 0,66 g d'hydrogénophosphate d'ammonium (4.7) dans un litre d'eau (4.5)

5.4.2 - Débit de la pompe (3.2.7.1) : 1 ml/minute

5.4.3 - Longueur d'onde du détecteur (3.2.7.2) : 278 nm



## 6 - RESULTATS

6.1 - Temps de rétention du chloramphénicol : environ 6,6 mn. S'assurer, par l'analyse d'échantillons de muscle exempt de chloramphénicol, qu'aucun pic interférent ne présente le même temps de rétention.

6.2 - Courbe d'étalonnage : construire la courbe d'étalonnage à partir des résultats obtenus avec les solutions étalons n° 3, 4, 5 et 6, correspondant à des concentrations dans la viande de 5 à 20 µg/Kg. Vérifier la linéarité de la réponse dans cet intervalle de concentrations.

6.3 - Rendement d'extraction : à partir des résultats obtenus avec les échantillons supplémentés, calculer le rendement d'extraction pour chaque concentration:

$$\frac{\text{Surface "Echan."}}{\text{Surface "Std"}} \times \frac{\text{Conc. "Std"} \times 0,7 \times 6}{\text{Conc. "Echan."} \times 5 \times 4,2} \times 100$$

où le second facteur est égal à 1.

"Echan." = échantillon

"Std" = solution étalon correspondante

Conc. = concentration

Le rendement moyen doit être voisin de 82 % pour le muscle de veau, avec un écart type de 5,5 environ pour la supplémentation à 10 µg/Kg.

6.4 - Echantillons à analyser : utiliser la courbe d'étalonnage et tenir compte du rendement d'extraction pour calculer la concentration en chloramphénicol lorsque celle-ci est supérieure à 5 µg/Kg (limite de quantification). La limite de détection, qualitative, est estimée à 2 µg/Kg.

## SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR

"Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, Fondateur de l'Enseignement Vétérinaire dans le Monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

- d'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire,

- d'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le Code déontologique de mon pays,

- de prouver par ma conduite, ma conviction que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire,

- de ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.

**"QUE TOUTE CONFIANCE ME SOIT RETIREE S'IL  
ADVIENNE QUE JE ME PARJURE".**



Claude BOURGELAT (1712-1779)

LE CANDIDAT

VU  
LE DIRECTEUR  
DE L'ECOLE INTER-ETATS  
DES SCIENCES ET MEDECINE  
VETERINAIRES

LE PROFESSEUR, RESPONSABLE  
DE L'ECOLE INTER-ETATS DES  
SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES

VU  
LE DOYEN  
DE LA FACULTE DE MEDECINE  
ET DE PHARMACIE

LE PRESIDENT DU JURY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER \_\_\_\_\_

DAKAR, LE \_\_\_\_\_

LE RECTEUR, PRESIDENT DE L'ASSEMBLEE DE  
L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR