République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia FARES de Médéa



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département Génie des Procédés et Environnement

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés Pharmaceutique

Thème

Mise au point d'une méthode alternative pour le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des viandes blanches

Réalisé par:

Boussila Fatima

Proposé et dirigé par :

M^{me} . Tassist Amina (Promotrice)

Promotion 2013-2014

Remerciements

je remercie DIEU de m'avoir accordé la santé ,la volonté , le courage et les moyens de réaliser ce travail.

*Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à la directrice de ce mémoire ;**Mme.Tassist Amina** pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils ;qui contribué à alimenter ma réflexion.*

Je remercie les membres du Jury, qui ont accepté de juger ce travail, à tous les enseignants et le chef de département de génie des procédés pharmaceutiques et environnement.

Je suis reconnaissante envers toute l'équipe du service de contrôle de qualité, service stérilité du groupe SAIDAL de MEDEA , le personnel du laboratoire d'analyse microbiologiques (DSP de Médéa) pour leur aide sans limites pendant ce travail.

Je remercie également :Mr Slama, inspecteur principal des vétérinaires (DDA),pour nous avoir facilité les prélèvements au niveau des abattoirs.

.

- Je remercie tous qui ont participé de loin ou de prés à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie mon mémoire de magistère :

- A ma mère qui n'est plus. Que Dieu l'accueille dans son vaste Paradis.

- A mon père.

- A mes chers frères : Madjid, Amine et Mouloud

- A ma très chère sœur : Amina .

- A toute ma famille.

- A tous mes amis de la promotion 2013-2014.

-A tous qui me connais de loin et de prés

Sommaire :

Partie théorique :

I- Généralités sur les antibiotiques 3

I-1 Définition : 3

I-2 Classification: 3

I-2-1 D'après leur origine : 3

I-2-2 D'après leur spectre d'action : 3

I-2-3 D'après leur mécanisme d'action : 4

I-2-4 D'après leurs Modes d'action [] (Figure I-3): 5

I-2-5 D'après leur propriétés physico- chimiques: Nous avons : 8

I-2-6 D'après la structure chimique : 8

I-3 Utilisation des antibiotiques dans les élevages d'animaux 9

I-3-1 Utilisation à titre thérapeutique curatif : 9

I-3-2 Utilisation en métaphylaxie : 9

I-3-3 Utilisation en antibio-prévention : 9

I-3-4 Utilisation en tant qu'additifs dans l'alimentation animale: 10

I-4 Mode d'administration des antibiotiques : 11

II- Effet des résidus d'antibiotiques : 11

II-1 Définition de « résidu » 11

II-2 Origine des résidus : 12

II-3 Pharmacocinétique et résidus 12

II-3-1 L'absorption et la distribution: 12

II-3-2 Les biotransformations : 12

II-3-3 L'élimination : 13

II-4 La limite Maximale de Résidus (LMR) : 13

II-5 Les délais d'attente : 15

II-6 Devenir des résidus chez l'homme : 16

II-6-1 Phénomène de dilution : 16
II-6-2 Phénomène d'absorption : 16
II-6-3 Phénomène de fixation : 16
II-7 Les risques présentés par les résidus : 16
II-7-1 Les réactions allergiques : 17
II-7-2 La foetoxicité : 18
II-7-3 Les autres effets dus à la présence de résidus : 18
III- Méthodes de dépistage des résidus : 18
III-1 Méthodes microbiologiques : 19
III-1-1 Facteurs influençant les résultats des méthodes microbiologiques: 19
III-2 Les méthodes microbiologiques les plus utilisées: 20
III-2-1 La méthode de référence (Méthode de 4 boites) : 20
III-2-2 Le prémi® Test : 21
III-2-3 La méthode STAR (Screening Test for Antibiotic Residues): 23
III-3 Méthodes physico-chimiques : 23
III-3-1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Figure III-2): 24
III-3-2 -Chromatographie sur couche mince CCM : 25
IV- Matériels et méthodes : 27
IV-1 Matériels : 27
IV-1-1 Matériels biologique 27
IV-1-2 Produits et milieux : 27
IV-1-3 Verrerie et petit matériel : 28
IV-1-4 Grand matériel : 28
IV-2 Méthodes : 28
IV-2-1 Sondage sur terrain : 28
IV-2-2 Analyse microbiologique au laboratoire par la méthode en boite unique: 29
IV-2-3 Mise au point de la méthode alternative: 35

V- Résultats et discussions : 42

V-1 Sondage sur terrain : 42

V-2 Analyse microbiologique au laboratoire par la méthode en boite unique: 43

V-2-1 Réactivation et dénombrement : 43

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés sur la Figure 15..... 43

V-2-3 Résultats de l'analyse par la méthode en boite unique: 44

V-3 Mise au point de la méthode alternative (Méthode en tubes): 46

V-3-1 Optimisations préliminaires sur le milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol » :..... 47

V-3-2 Optimisations préliminaires sur le milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl» : 49

V-3-3 Test en présence d'un échantillon à la limite de la positivité (*Essai de faisabilité)*: 52

V-3-4 Test des échantillons négatifs et positifs : 54

VI- Conclusion : 58

Liste des tableaux :

Tableau 2: Limites maximales des résidus de certains antibiotiques dans le muscle et le foie de poulet [31,13]. 14

Tableau 3:Tableau de référence pour la lecture de l'antibiogramme. 33

Tableau 4 : Résultats de l'antibiogramme de *M. luteus* (quelques exemples de zones d'inhibition). ... 44

Tableau 5 : Nombre et pourcentage des échantillons positifs et négatifs analysés par la méthode en boite unique. 45

Tableau 6 : observation de la croissance de *M. luteus* et la flore d'un jus de viande sur le milieu « Mueller et Hinton + NaCl ». 49

Tableau 7 : Observations notées concernant la croissance ainsi que virage de la couleur du milieu Mueller et Hinton additionné de NaCl et de bleu de bromothymol. 50

Liste des figures :

Figure 1: Effet bactériostatique des antibiotiques : détermination de la CMI 4

Figure 2: Effet bactéricide des antibiotiques: détermination de la CMB 5

Figure 3: Modes d'action des antibiotiques 5

Figure 4: Schéma décrivant le calcul du temps d'attente 15

Figure 5: Technique du premi®Test 22

Figure 6: Schéma du principe d'un chromatographe en phase liquide 24

Figure 7: Dispositif de la chromatographie sur couche mince 26

Figure 8: Protocole de réactivation des souches..... 31

Figure 9 : Procédé générale du dénombrement. 32

Figure 10: Technique de la méthode en boite unique..... 34

Figure 11: Détermination de l'inoculum bactérien minimal: Protocol expérimental..... 38

Figure 12 : Essai de faisabilité, cas du milieu 40

Figure 13 : Test des échantillons positifs et négatifs..... 41

Figure 14: Exemple d'un schéma de gestion d'un élevage de poulet sur le plan antibiothérapie. 42

Figure 15 : Zones d'inhibitions obtenues pour *Micrococcus luteus.*..... 43

Figure 16: Résultats des échantillons analysés après incubation. 45

Figure 17 : Résultat du dépistage globale des résidus d'antibiotiques par la méthode en boite unique.45

Figure 18 : Aspect du milieu Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à différentes concentration avant et après incubation. 48

Figure 19 : Virage de la couleur du milieu additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l après 24H d'incubation..... 49

Figure 20 : Croissance de *M. luteus* et la flore d'un jus de viande sur le milieu « Mueller et Hinton + NaCl ». C $_{NaCl}$: 30g/l-60g/l...... 50

Figure 21 : Aspect du milieu Mueller et Hinton additionné de NaCl et de bleu de bromothymol à différentes concentrations après incubation. 51

Figure 22 : Virage de la couleur du milieu additionné de Na Cl à 50g/l et de bleu de bromothymol à 0,01g/l après 24H d'incubation. 52

Abréviations :

CMI	**C**oncentration **M**inimale **I**nhibitrice
CMB	**C**oncentration **M**inimale **B**actéricide ;
PBP	**P**énicilline **B**inding **P**rotéines ;
ADN	**A**cide **D**ésoxyribo**n**ucléique
PAB	**P**ara-**A**mino-**B**enzoïque
DHF	: Dihydrofolate ;
DHPS	Dihydroptéroate Synthétase
DHFR	Dihydrofolate Réductase ;
ARF	**A**ntibiotiques **R**égulateurs de la **F**lore ;
AGP	: **A**ntibiotic **G**rowth **P**romotors ;
LMR	: **L**imite **M**aximale des **R**ésidus ;
CVMP	**C**ommitty of **V**étérinary **M**edcin **P**roducts ;
AFSSA	**A**gence **F**rançaise de **S**écurité **S**anitaire des **A**liments
STAR	**S**creening **T**est for **A**ntibiotic **R**esidues ;
UFC	**U**nité **F**ormant **C**olonie.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استخدام طرق ميكروبيولوجية حديثة بديلة واقتصادية من الناحية المالية للكشف عن بقايا المضادات الحيوية في اللحوم البيضاء خاصة لحم الدجاج لأنه الأكثر استهلاكا . إن تطبيق هذه الطرق على العينات المختبرة (37 عينة) أعطتنا النتائج التالية : 15عينة من المجموع الكلي للعينات تحتوي على بقايا المضادات الحيوية أي بنسبة 40.54% . إن الطرق البديلة أعطت نتائج جيدة بوسائل و إمكانيات مقتصدة على الطرق البيولوجية المعتمدة .

كلمات مفاتيح : اللحوم البيضاء, بقايا المضادات الحيوية ,طرق بديلة.

Résumé :

Cette étude vise à utiliser des méthodes microbiologiques alternatives et économiques pour la détection des résidus d'antibiotiques dans la viande blanche, en particulier le poulet qui est le plus consommé. L'application de ces méthodes sur des échantillons testés (37 échantillons) nous a donné les résultats suivants: 15 échantillons contenant des résidus d'antibiotiques ce qui correspond à un pourcentage de 40,54%. Les méthodes alternatives ont donné de bons résultats avec des moyens économiques comparables à ceux des méthodes biologiques adoptés.

Mots clés: Résidus d'antibiotiques, Les viandes blanches, Méthodes alternatives.

Abstract:

This study aims to use alternative and economic microbiological methods for detection of antibiotic residues in white meat, especially in chicken because it is the most consumed. The application of these methods on tested samples (37 samples) gave the following results: 15 samples containing antibiotic residues (40.54%). Alternative methods have yielded good results with economic means comparable to adopted biologic methods.

Keywords: Antibiotic residues, White meat, Alternative methods**.**

.

Introduction

En Algérie le développement de l'aviculture constitue le meilleur recours pour répondre à un besoin galopant des consommateurs en protéines animales. Elle est indéniablement la branche de productions animales qui a enregistré le plus remarquable essor au cours de ces dernières années. En fait, la consommation des viandes rouges fraiches et des poissons frais reste un luxe pour la majorité de la population algérienne. Le consommateur algérien a tendance à préférer les viandes blanches et plus précisément celle du poulet de chair pour satisfaire les besoins en protéines animales à moindre prix. Les abats ont aussi un pourcentage de consommation élevé à cause de leur prix abordables et leur richesse en fer et en vitamines.

Les antibiotiques ont une place importante dans l'élevage moderne d'aujourd'hui. Ils sont utilisés à titre préventifs, thérapeutique et comme facteurs de croissance. Leur utilité économique est donc indéniable. Il convient donc de s'interroger sur les risques qu'encourent les consommateurs à cause de la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Notre travail est basé sur la recherche des résidus d'antibiotiques dans le muscle du poulet de chair en utilisant deux méthodes microbiologiques. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- une enquête sur terrain effectuée au niveau du pharmacien grossiste et du vétérinaire afin d'avoir une idée sur les différentes familles et molécules d'antibiotiques utilisées dans l'élevage aviaire en Algérie,
- un dépistage global des résidus d'antibiotiques par la méthode boite unique,
- une optimisation puis une application d'une méthode alternative de présélection dite : méthode en tubes.

Notre étude est subdivisée en deux parties :

- une partie théorique traitant en détail des généralités sur les antibiotiques, les normes liées à leur utilisation au niveau des élevages ainsi que leurs effets sur la santé de consommateur et leurs méthodes de dépistage au niveau des denrées alimentaires d'origines animales.
- une partie pratique visant dans un premier volet le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau de 37 échantillons de muscle de poulet prélevés dans la région du centre de l'Algérie. Ce dépistage a été réalisé par une méthode microbiologique en boite unique.

Dans un deuxième volet de notre partie expérimentale, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une alternative en tubes pour le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des mêmes échantillons. Cette méthode repose sur l'inhibition du virage de la couleur d'un milieu ensemencé d'une souche multi-sensible en contact du jus d'échantillons porteurs de résidus d'antibiotique à des concentrations supérieurs à la LMR. Les paramètres pris en compte pour cette mise au point sont : la concentration de l'indicateur coloré et du NaCl dans le milieu, la charge de l'inoculum, la forme et le volume du dépôt de l'échantillon ainsi que la duré d'incubation.

En fin, cette mise au point ne constitue qu'un début à des études plus détaillés visant la validation réelle de cette méthode.

I- Généralités sur les antibiotiques

I-1 Définition :

On désigne habituellement sous le terme ***« antibiotiques »*** des substances naturelles produites par des microorganismes et susceptibles d'inhiber la croissance de certains microbes [**1**], [**2].**

Un antibiotique est une substance élaborée par des microorganismes vivants (champignons ou bactéries) ou une substance analogue, élaborée de façon synthétique ou semi- synthétique, capable d'inhiber même à dose très faible, le développement de microorganismes pathogènes (substance bactériostatique) et parfois de les détruire (substance bactéricide) **[3]**.

Les antibiotiques sont dotés d'une toxicité sélective envers les micro-organismes visés, et au contraire d'une toxicité suffisamment faible vis-à-vis de l'hôte (humain animal) **[4]**.

I-2 Classification:

Il existe actuellement plus de 10 familles d'antibiotiques. Ces familles se distinguent par les propriétés physico-chimiques communes des molécules qu'elles contiennent. Chaque molécule dispose d'un mode d'action et d'un spectre bien à elle **(Erreur ! Source du renvoi introuvable.)** Leur classification actuelle suit plusieurs critères. ***Ferron (1986)*** classe les antibiotiques comme suit :

I-2-1 D'après leur origine :

Les antibiotiques naturels peuvent prévenir de plusieurs sources, comme : les bactéries (exemple les actinomycètes), les champignons, les lichens, les végétaux supérieurs et les animaux. Ils peuvent être aussi semi-synthétiques ou synthétiques **[5]**.

I-2-2 D'après leur spectre d'action :

Les antibiotiques peuvent posséder:

- ✓ un spectre très large,
- ✓ un spectre moyen à prédominance sur les bactéries gram-positif,
- ✓ un spectre étroit, sur les bactéries gram-négatif **[5]**.

I-2-3 D'après leur mécanisme d'action :

Nous avons **[5]** :

- ✓ **Les antibiotiques bactériostatiques** : ce sont les antibiotiques qui bloquent la croissance bactérienne.
- ✓ **Les antibiotiques b*actéricides* :** ce sont les antibiotiques qui tuent les bactéries, comme les aminosides, quinolones.

Les deux paramètres qui explorent l'effet des antibiotiques sur le développement des microorganismes sont **(Figure 1 et**

Figure 2) :

- ✓ **La concentration minimale d'inhibition (CMI*):*** C'est le paramètre le plus utilisé pour évaluer l'effet de l''antibiotique. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24heures donc, la CMI explore seulement l'effet bactériostatique **[6]**.

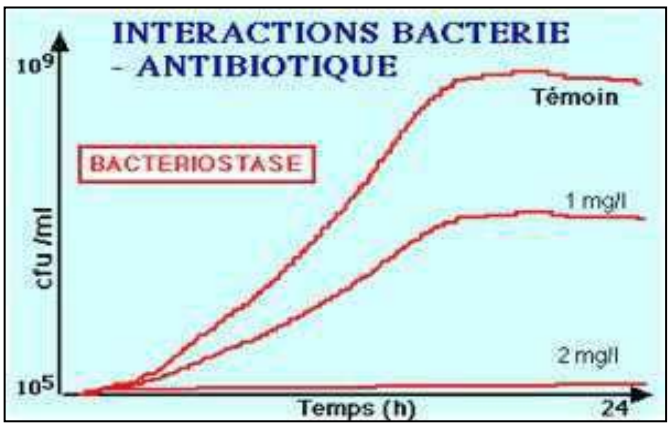


Figure 1: Effet bactériostatique des antibiotiques : détermination de la CMI [7].

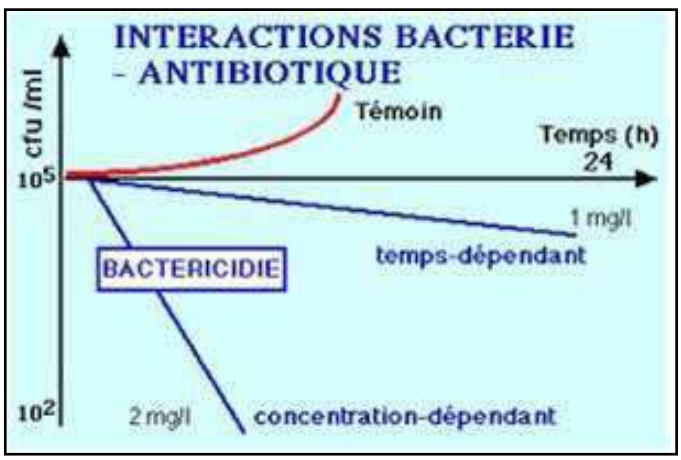


Figure 2: Effet bactéricide des antibiotiques: détermination de la CMB [7].

✓ **La concentration minimale bactéricide (CMB) :** Certains antibiotiques provoquent une mortalité bactérienne à partir d'une certaine concentration seuil. Cette bactéricidie s'effectue selon deux modalités **[6]**. Elle peut être :

- dépendante du temps d'exposition ou « temps dépendante » **[8]**.

- proportionnelle à la concentration de l'antibiotique ; on parlera alors de mortalité dépendante de la concentration ou « concentration dépendante » **[8]**.

I-2-4 D'après leurs Modes d'action [9] (Figure I-3):

✓ Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne,

✓ Antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique,

✓ Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines,

✓ Antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléique.

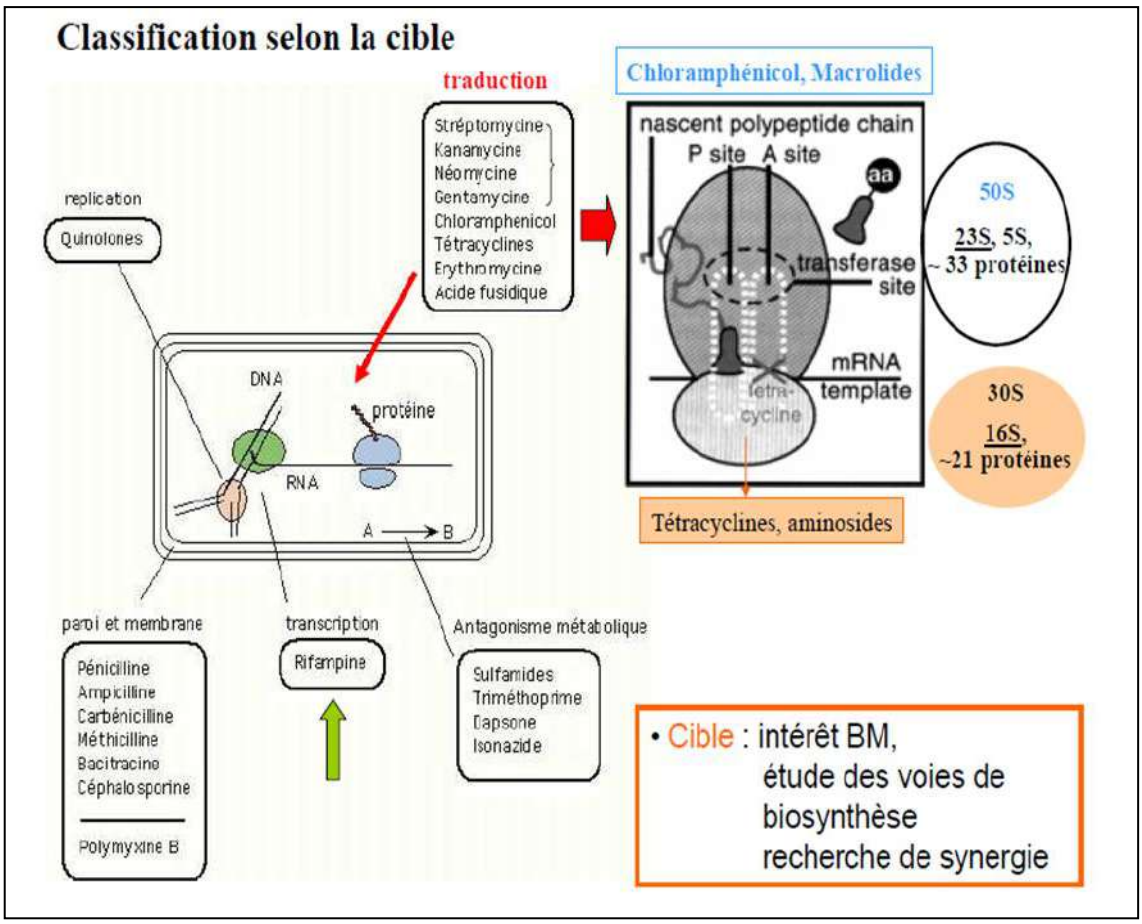


Figure 3: Modes d'action des antibiotiques [7].

I-2-4-1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :

La synthèse de la paroi bactérienne est inhibée par les béta-lactamines (les pénicillines et les céphalosporines), les Glycopeptides, la fosfomycine et la bacitracine. Ces antibiotiques se fixent les protéines enzymatiques membranaires (pénicilline Binding protéines, PBP) : les transpeptidases nécessaires à la synthèse du peptidoglycane bactérien. Il en résulte la formation d'une paroi incomplète aboutissant à la création de bactéries de formes anormales parfois filamenteuses qui finissent par éclater. Ce mode d'action explique que les béta-lactamines n'agissent que sur les bactéries jeunes en phase de croissance, et non sur les germes qui ne se multiplient pas. Ces antibiotiques sont actifs surtouts sur les bactéries gram positif, car ils traversent facilement le peptidoglycane, qui ne constitue pas une barrière **[7, 8, 9]**.

I-2-4-2 Antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique :

Les polymyxines, polymyxine B ou polymyxine E (ou colistine), sont constituée d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras. Par leur extrémité hydrophobe, ces antibiotiques pénètrent à l'intérieur de la membrane et s'incorporent à la couche lipidique en orientant l'extrémité hydrophile vers l'extérieur. Il en résulte une désorganisation de la structure membranaire ce qui provoque la mort de la cellule **[8]**.

Ces antibiotiques, sont capables de détruire la membrane cytoplasmique après avoir désorganisé la membrane externe des bactéries à Gram négatif **[8]**.

I-2-4-3 Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines :

Les antibiotiques de cette catégorie les plus importants en médecine sont les aminosides, les phénicols, les macrolides, les tétracyclines et la rifampicine. La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien. Il faut donc, pour toutes ces molécules, traverser le peptidoglycane et les diverses membranes pour arriver dans le cytoplasme et atteindre leur cible: le ribosome bactérien **[9].**

Les aminoglycosides (aminosides), exemples : streptomycine, gentamycine, amikacine, sont des molécules des molécules bactéricides puissantes, de petite taille, qui traversent de manière passive les pores de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et ensuite le

peptidoglycane des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, pour se concentrer au niveau de la membrane cytoplasmique **[10]**. Ils se fixent sur la petite sous unité ribosomale (30 Svedberg) empêchement la traduction de l'ARN_m et conduisant à des erreurs de lecture **[9]**.

Les phénicols, exemple : chloramphénicol, thiamphénicol, bloquent la formation de la liaison peptidique. Ils se fixent sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien (50 Svedberg) mais pas sur celle des ribosomes eucaryotes **[10]**.

Les cyclines, exemple : les tétracyclines, se fixent sur la sous-unité (30s), Cette liaison empêche la fixation du complexe ARN de transfert-acide aminé au complexe ribosome-ARN messager. L'inhibition de la synthèse protéique par les tétracyclines n'est pas limitée aux bactéries. Cependant, ces antibiotiques sont concentrés dans les bactéries par un mécanisme de pénétration transmembranaire actif, qui n'existe pas dans les cellules animales **[10]**.

Les macrolides et apparentés, exemples : érythromycine et azithromycine, agissent sur la partie 50s du ribosome et bloquent l'élongation de la chaine polypeptidique. L'impossibilité pour ces molécules de traverser la membrane externe des bacilles à Gram négatif, du fait de leur grande taille et de leur hydrophobicité, explique leur absence d'activité sur ces bactéries **[9]**.

I-2-4-4 Antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléique (ADN) :

La mytomycine, l'actinomycine sont des molécules qui se fixent sur les brins de l'hélice de l'ADN et établit un pontage entre eux. Ceci empêche la réplication de l'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase **[9]**.

Les quinolones et fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides inhibent l'ADN gyrase, enzyme qui contrôle le surenroulement de l'ADN. L'inhibition de la gyrase empêche la réplication de l'ADN et donc la croissance des bactéries. Avant d'atteindre leur cible, ces antibiotiques traversent les diverses structures membranaires de manière passives **[10]**.

Les sulfamides et le triméthoprime sont les analogues structuraux de l'acide para-amino-benzoïque (PAB) et du dihydrofolate (DHF), respectivement. Ils sont donc des inhibiteurs compétitifs des deux enzymes dihydroptéroate synthétase (DHPS) et dihydrofolate réductase (DHFR). La fabrication des acides nucléiques engagés dans la synthèse de l'ADN est

diminuée, ce qui ralentit la croissance bactérienne. Ces antibiotiques sont bactériostatiques **[9]**.

I-2-5 D'après leur propriétés physico- chimiques: Nous avons :

- ✓ Les antibiotiques à caractère acide ;
- ✓ Les antibiotiques à caractère basique ;
- ✓ Les antibiotiques à caractère amphotère **[5]**.

I-2-6 D'après la structure chimique :

Les antibiotiques sont classés en plusieurs familles. Chaque famille regroupe les molécules ayant une structure de base commune. Le **Tableau 1** résume les familles des antibiotiques, leurs modes d'action, leurs origines et leurs spectres d'action **(Annexe I)**

I-3 Utilisation des antibiotiques dans les élevages d'animaux

Les antibiotiques sont largement utilisés dans les élevages d'animaux : Bovins, porcs, dindons, poulets. Ils sont utilisés de quatre façons différentes chez les animaux de production, et avec des objectifs différents [**11**].

I-3-1 Utilisation à titre thérapeutique curatif :

Les antibiotiques peuvent être utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité **[12].** Le traitement a aussi pour effet de réduire la souffrance et de restaurer la production (lait, viande). Il réduit l'excrétion bactérienne, permettant dans certains cas d'obtenir une guérison bactériologique et, lors d'infection zoonotique, il peut éviter la contamination humaine **[13]**.

I-3-2 Utilisation en métaphylaxie :

Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes. La métaphylaxie est généralement mise en œuvre à partir d'un seuil d'atteinte des animaux au sein du lot de 10 à 15 % de l'effectif **[14]**.

I-3-3 Utilisation en antibio-prévention :

Les antibiotiques peuvent être administrés à des périodes critiques de la vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue. Dans ces conditions, on parle d'antibio-prévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire et ponctuelle. L'antibio-prophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes (par exemple, lors d'une césarienne).

I-3-4 Utilisation en tant qu'additifs dans l'alimentation animale:

L'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs est très limité actuellement. Ces « antibiotiques régulateurs de flore » (ARF) ou « antibiotiques promoteurs de croissance » (AGP, « antibiotic growth promotors ») sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et en vue d'améliorer la croissance des animaux par un effet régulateur au niveau de la flore intestinale. Ces antibiotiques sont tous des agents chimio-thérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur pour la médecine humaine **[15]**.

C'est en 1950 que les premiers antibiotiques furent utilisés comme additifs dans les élevages. Dix ans plus tard, des centaines bactéries apparaissaient déjà résistantes. En 1969, suite à l'émission d'un rapport affirmant qu'on risquait de sélectionner chez les animaux des bactéries résistantes transmissibles à l'humain, la communauté européenne prit une décision, celle d'interdire l'usage, chez les animaux, des antibiotiques utilisés pour les humains **[13]**.

La directive 70/254/CEE du Conseil de l'Union Européenne subordonnait l'utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs à une autorisation des principes actifs dans des conditions d'utilisations définies pour chaque espèce de destination, à des doses faibles. Cette utilisation était très controversée et en 1998 : quatre antibiotiques avaient été supprimés au sein de l'Union Européenne (virginiamycine, bacitracine Zinc, spiramycine, phosphate de tylosine) **[13]**.

Dans son avis du 28 mai 1999, le comité scientifique directeur de la Direction Générale de la Commission Européenne (DG SANCO), a déclaré que l'utilisation en tant que facteurs de croissance d'antimicrobiens appartenant aux catégories utilisées en médecine humaine et animale, ou susceptible de l'être (c'est-à-dire lorsqu'il existe un risque de résistance croisée aux agents de traitement des infections bactériennes), devait être réduite le plus vite possible et à terme, proscrite. Dans un deuxième avis, adopté en mai 2001, ce comité directeur soulignait que ce processus d'élimination devait être planifié et coordonné, car des mesures prises à la hâte pouvaient avoir des répercussions sur la santé animale **[15]**.

Selon le règlement 1831/2003 du 22/11/2003, entré en vigueur en octobre 2004, qui abrogeait et remplaçait la directive 70/254/CEE, aucune nouvelle autorisation d'antibiotiques, autre que les coccidiostatiques ou les histomonostatiques, ne pouvait être délivrée en tant qu'additifs pour l'alimentation animale. Ceci devant être compensé par des progrès réalisés en matière d'élaboration de substances de remplacement et d'autres méthodes de gestion,

d'alimentation des animaux et d'hygiène. Ce règlement 1831/2003 prévoyait aussi la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale **[13]**.

I-4 Mode d'administration des antibiotiques :

En élevage aviaire, les antibiotiques peuvent être administrés aux animaux à titre individuel par voie orale (drogage, comprimés) ou par injection parentale et à titre collective dans l'aliment ou dans l'eau de boisson. Leur innocuité pour l'animal et pour le consommateur, ainsi que leur efficacité, doivent être démontrées. Des garanties de constance de composition et de pureté sont également exigées **[16]**.

II- Effet des résidus d'antibiotiques :

Au cours de leur vie, les animaux doivent parfois être traités avec des médicaments destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies. Il arrive que des résidus de ces médicaments aboutissent dans des produits alimentaires (viande, lait ou œufs, par exemple) provenant d'animaux producteurs d'aliments tels que bovins, porcins, volailles et poissons **[2]**.

II-1 Définition de « résidu »

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux antibiotiques reçus par l'animal. La définition de résidus est modifiée dans une directive européenne (DIRECTIVE81/851/ CEE, 1981). Dans cette Directive, les résidus sont définis comme étant « *tous* les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré».

Le règlement 2377/90/CEE modifie légèrement cette définition en la complétant. Les résidus sont définis comme toute substance pharmacologiquement active, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux **[13].**

II-2 Origine des résidus :

Les résidus sont des substances pouvant apparaître dans les denrées alimentaires par suite de l'utilisation de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires. Il s'agit de traces indésirables de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final **[17].**

II-3 Pharmacocinétique et résidus

Après administration orale ou parentérale d'un médicament à un animal, on distingue classiquement quatre étapes pharmacocinétiques :

II-3-1 L'absorption et la distribution:

L'absorption correspond à la phase de dissolution du médicament et à l'apparition du ou des principes actifs dans le sang. Le principe actif est ensuite transporté dans le sang par la circulation sanguine et diffuse dans les organes et les tissus : c'est la phase de distribution. En règle générale, on observe deux fractions du principe actif dans le sang, une fraction libre et une fraction liée aux protéines plasmatiques. La fraction qui diffuse dans les organes et les tissus correspond à la fraction libre et on observe alors une fixation tissulaire. Les principes actifs dont la fixation tissulaire est la plus importante laisseront en général le plus de résidus **[18].** La liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires constitue un important facteur de modulation de la distribution des antibiotiques. Les antibiotiques dont la molécule est un acide faible (pénicillines, sulfamides, céphalosporines), ont une affinité plus grande pour les protéines plasmatiques que pour les protéines tissulaires. Ils ont un volume de distribution assez limité et ne s'accumulent pas dans les cellules. Les bases faibles dont la forme non ionisée est liposoluble (macrolides), les alcools (chloramphénicol) et les substances amphotères (tétracyclines), ont un volume de distribution plus important.

II-3-2 Les biotransformations :

Au sein des tissus, a lieu des biotransformations ou métabolisme qui sont un ensemble de réactions chimiques, en général catalysées par des enzymes, ayant pour effet de modifier la structure des principes actifs. On observe par exemple des oxydations, des hydroxylations, des réductions ou des hydrolyses **[18]**.

Les biotransformations peuvent conduire à une inactivation et une détoxication des principes actifs vis à vis de l'organisme ou au contraire à un processus d'activation. Les réactions métaboliques que subissent les principes actifs peuvent conduire à une détoxication de deux façons **[18]**:

- ✓ par inactivation, c'est-à-dire par blocage chimique des groupements responsables de l'activité pharmacologique ou toxique,
- ✓ par augmentation de l'hydro solubilité favorisant l'élimination urinaire. Mais elles peuvent aussi parfois conduire à une augmentation voire à une apparition d'activité pharmacologique.

Les biotransformations représentent un phénomène majeur dans le processus de formation des résidus : elles conditionnent en effet en grande partie la persistance des substances médicamenteuses dans l'organisme des animaux traités (et dans les denrées issues de ces animaux), la nature des résidus et leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques. Ainsi, seule une fraction des résidus présents dans les tissus des animaux, est identique à la molécule originelle, l'autre fraction correspondant à divers métabolites de cette molécule **[18]**.

II-3-3 L'élimination :

L'élimination est la dernière phase du devenir du médicament. Elle s'effectue par différentes voies **[18]**:

- ✓ par voie rénale, dans l'urine,
- ✓ par voie biliaire, dans les matières fécales,
- ✓ par élimination dans les œufs,
- ✓ par élimination lactée, dans le lait.

La ou les voies d'élimination d'un principe actif antibiotique dépendent de ses caractéristiques pharmacocinétiques **[18]**.

II-4 La limite Maximale de Résidus (LMR) :

La notion de LMR a remplacé la notion de « zéro résidu » est la concentration maximale en résidus dans un produit (lait, viande, œuf…) que les scientifiques et les autorités considèrent sans risque sanitaire pour le consommateur et sans effet sur les processus de fabrication. Cette LMR ne doit pas être dépassée pour des aliments issus des productions

animales. La notion de LMR constitue une synthèse entre les attentes des consommateurs et les contraintes des producteurs permettant, sans interdire l'utilisation des médicaments, leur usage en toute sécurité. Cette LMR est calculée en prenant en compte d'une part le risque toxicologique et, d'autre part, l'effet potentiel des résidus sur la flore digestive de l'homme **[19]**.

Les LMR sont fixées au niveau communautaire par le C.V.M.P (Committy of veterinary medecin Products) et ont une valeur réglementaire; elles sont publiées au journal officiel des communautés. La fixation de L.M.R signifie que le potentiel toxique du médicament est parfaitement connu et que le consommateur n'encourt aucun risque si ces L.M.R sont respectées. Le fait que des L.M.R ne soit pas fixées pour tous les vecteurs alimentaires tiennent surtout au manque d'information pharmacocinétiques sur la répartition des résidus dans certains tissus **[20]**.

Dans le **Tableau 2**, les limites maximales des résidus dans le muscle et le foie de poulet sont présentées, d'après le règlement fixé par CEEn°2377/90 du conseil du 4mars 1999.

Tableau 1: Limites maximales des résidus de certains antibiotiques dans le muscle et le foie de poulet [31,13].

Antibiotique	LMR (muscle) (µg/Kg)	LMR (foie) (µg/Kg)
Ampicilline	50	50
Amoxicilline	50	50
Erythromycine	100	100
Chlortétracycline	100	300
Streptomycine Dihydrostreptomycine	500	500
Spiramycine	200	400
Dihydrostreptomycine	500	500
Pénicilline	50	50
Sulfisoxazole	100	100
Oxacilline	300	300
Enrofloxacine (dinde)	100	300
Danofloxacine	200	400

II-5 Les délais d'attente :

Le délai d'attente et le temps minimum qui doit s'écouler entre le moment de la dernière administration du médicament à l'animal et le moment ou les produits provenant de cet animal (viande, abats, œufs, lait) peuvent être récoltés en vue de la consommation (abattage des animaux pour la viande et les abats, collecte des œufs et du lait…) **[20].**

La détermination du temps d'attente, résulte de la comparaison des concentrations résiduelles présentes dans l'organisme aux limites maximales de résidus **(Figure 4).** En Europe, le temps d'attente est défini comme étant la limite supérieure de l'intervalle de tolérance à 95% dans laquelle les teneurs résiduelles tissulaires soient inférieures aux LMR avec un intervalle de confiance de 95%. En d'autres termes, le temps d'attente est défini par une probabilité caractérisant un risque (5%) d'avoir 5% des animaux dont les teneurs résiduelles tissulaires soient supérieures à la LMR. Ce temps d'attente est proposé par l'industriel et est validé au cours de la procédure d'autorisation de mise sur le marché pour des indications précises et pour une posologie définie (dose, durée d'administration) chez une espèce. L'allongement du traitement n'est pas, en règle générale (sauf accumulation), une cause à allonger le temps d'attente. En revanche, l'augmentation des doses allonge le temps d'attente parce que les concentrations des principes actifs sont plus élevées dans l'organisme. Mais il n'est pas possible de dire de combien le délai d'attente est prolongé, sans connaître la vitesse d'élimination des résidus **(Figure 4) [21]**.

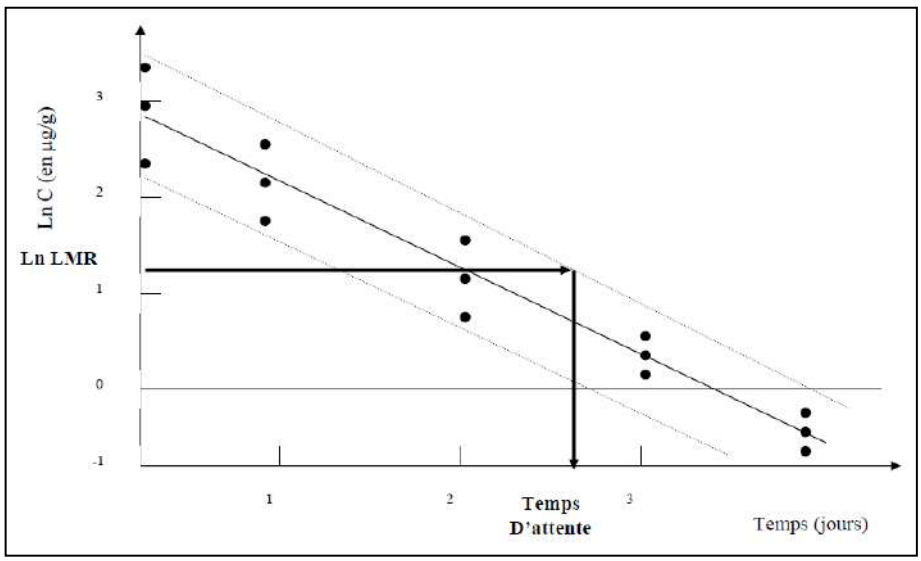


Figure 4: Schéma décrivant le calcul du temps d'attente [21].

II-6 Devenir des résidus chez l'homme :

Les résidus présents dans les aliments subissent, au cours du transit intestinal du Consommateur de ceux-ci, des phénomènes de dilution en fonction du volume intestinal, des phénomènes d'absorption ou encore de diverses biotransformations.

II-6-1 Phénomène de dilution :

Dans la première partie du tube digestif (estomac, intestin grêle), les résidus d'antibiotiques sont dilués par les autres aliments, l'eau de boisson, les sécrétions gastriques, salivaires et intestinales : cela représente environ 8 litres par jour. Le facteur de dilution peut être estimé entre 10 et 20 **[22]**.

II-6-2 Phénomène d'absorption :

L'absorption a aussi un rôle important: certains résidus d'antibiotiques fortement résorbés n'auront qu'une faible action sur la flore digestive. Par ailleurs, on assiste à une forte concentration des éléments non absorbés dans la partie distale du tube digestif. Le facteur de concentration des résidus est alors d'environ 3 à 5, compte tenu du poids moyen de la matière fécale journalière chez l'homme qui est de 150 g. Ce paramètre est important pour les antibiotiques très peu résorbés comme les aminosides, les antibiotiques polypeptidiques ou certains sulfamides **[22]**.

II-6-3 Phénomène de fixation :

La liaison des résidus aux protéines fécales est peu connue. Par analogie avec ce qui se passe dans le sérum, on peut penser que certains résidus d'antibiotiques se fixent en partie sur les protéines du contenu intestinal.

II-7 Les risques présentés par les résidus :

Les risques pour le consommateur et la Santé Publique liés à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires sont [23]

- ✓ Risque de toxicité directe (nitrofuranes),

- ✓ Risque allergique (pénicillines, streptomycine),
- ✓ Risque cancérigène (nitrofuranes),
- ✓ Risque de pathologie liée à la modification de la flore digestive (tétracyclines),
- ✓ Risque d'apparition, de sélection et de dissémination de résistances bactériennes aux antibiotiques au sein des populations humaines et animales.

Les effets des résidus d'antibiotiques sur l'organisme humain dépendent de deux facteurs **[24]**:

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

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

II-7-1 Les réactions allergiques :

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des beta-lactames. Quant aux macrolides, ils causent peu d'effets secondaires et seulement très peu d'entre eux semblent causés par des mécanismes allergiques. Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotique administrées lors des traitements ou de prophylaxies, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu **[25]**.

D'autant plus que lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale, ils subissent des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène. Les résidus de pénicilline en particuliers forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes. Ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessible aux anticorps. Il est donc peu probable que des dérivés significativement immunogènes puissent être formés **[25, 24]**. Cependant des cas d'allergies aux résidus de pénicilline dans les aliments d'origine animale ont été scientifiquement prouvés **[26]**.

II-7-2 La foetoxicité :

Les nitrofuranes sont soupçonnés de foetotoxicité. Certains sulfamides sont foetotoxiques à forte dose. Ces molécules passent dans le lait maternel, et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un mois.

II-7-3 Les autres effets dus à la présence de résidus :

Les autres effets potentiellement dus aux résidus sont d'ordre toxicologique et pharmacologique. On note entre autre une modification de la flore intestinale humaine. (Boisseau, 1993) **[27]**.

Ainsi certaines molécules comme le chloramphénicol, sont interdites en Europe sur les animaux de vente, en raison du risque potentiel d'apparition d'effet secondaires tels que des formes idiosyncratiques, d'anémie aplasique chez l'homme. Cet effet secondaire a été mis en évidence non seulement lors de traitements systémiques mais aussi lors d'application locale et même lors d'exposition professionnelle **[27]**.

Des études in vivo sur de modèles animaux visant à évaluer les effets de doses thérapeutiques et de résidus de tétracyclines sur la flore intestinale humaine ont mis en évidence les modifications engendrées sur la flore intestinale. Il y a effectivement eu une sélection de bactéries résistantes à la tétracycline, ainsi qu'un effet sur les populations fécales aérobies et anaérobies, sans compter les modifications de certains paramètres métaboliques de la microflore. Par contre, la barrière contre la salmonelle exogène a été maintenue **[27]**.

III-Méthodes de dépistage des résidus :

Afin de détecter les fraudes liées au non-respect du délai d'attente lors de l'usage des antibiotiques dans un élevage, plusieurs méthodes ont été mises au point. Les procédés les plus utilisés font appel à des méthodes microbiologiques permettant de détecter la plupart des antibiotiques, ces méthodes sont basées sur l'utilisation d'un milieu gélosé ensemencé avec une souche bactérienne test choisie pour sa grande sensibilité à l'antibiotique à mettre en évidence [**28**]. D'autres méthodes sont quantitatives permettant d'évaluer la teneur de ces antibiotiques (en µg/Kg de viande analysée).

III-1 Méthodes microbiologiques :

III-1-1 Facteurs influençant les résultats des méthodes microbiologiques:

III-1-1-1 Facteurs liés au milieu gélosé :

La composition chimique du milieu et son pH, interfèrent sur la diffusion et l'activité de l'antibiotique ainsi que sur la croissance de la souche test. Le choix de ce milieu doit être donc judicieux tenant compte de la nature de l'antibiotique à détecter (chaque antibiotique possède un pH optimum d'activité) et de l'identité de la souche indicatrice **[28]**.

III-1-1-2 Facteurs liés à la souche bactérienne test :

Le choix de la souche bactérienne doit tenir compte des critères suivants :

-elle doit être sensible à l'antibiotique que l'on veut détecter,

-sa croissance dans le milieu gélosé utilisé doit être bonne, rapide, de manière à ce que les diamètres des zones d'inhibition soient visibles. La croissance dépend essentiellement de la dilution finale de l'inoculum microbien dans la gélose qui doit être parfaitement définie **[28]**.

Les genres les plus utilisés dans les méthodes microbiologiques :

***Micrococcus* :** Les microcoques sont des cocci à Gram positif**,** leur culture sur gélose au sang, montre des colonies jaune pâle. L'espèce la plus utilisée pour la détection des résidus d'antibiotique est *Micrococcus luteus*.

Bacillus : Les espèces de Bacillus sont des bacilles à Gram positif sporulés. Beaucoup ne sont pas pathogènes, mais *B. anthracis* est l'agent de la maladie du charbon **[29]**. Les espèces les plus utilisées sont : *Bacillus subtilis* et *Bacillus stearothermophilus*.

Escherichia : Il s'agit d'une entérobactérie, de forme Cocco-bacillaire à Gram négatif, l'espèce la plus utilisée est *Escherichia coli* **[29]**.

III-1-1-3 Facteurs liés à l'antibiotique :

Le poids moléculaire des antibiotiques joue un rôle prépondérant : s'il est élevé (cas des polypeptides) il ne facilite pas la diffusion, s'il est par contre faible (fosfomycine), il la favorise trop et rend l'interprétation délicate **[28]**.

III-1-1-4 Facteurs liés à la source d'antibiotique et au diluant utilisé :

L'antibiotique à détecter peut se trouver dans diverse matrices selon l'échantillon analysé (lait, œuf, viande, foie ….). Sa diffusion dans le milieu est donc conditionnée par la nature de la matrice dont laquelle il se trouve.

La qualité du papier-filtre qui constitue les disques utilisés dans certains protocoles techniques doit être excellente. En effet ces disques dont la limite d'absorption est en principe définie, doivent restituer la quasi-totalité de la solution d'imprégnation et donner des zones d'inhibition parfaitement concentriques **[28]**.

Les concentrations de la gamme étalon sont réalisées dans un milieu dont la composition doit se rapprocher le plus possible du celle du liquide biologique à doser **[28]**.

III-2 Les méthodes microbiologiques les plus utilisées:

Comment rechercher, de manière simple, dans un morceau de viande, la présence d'un antibiotique parmi des dizaines de molécules différentes ? Les méthodes utilisées pour les analyses sont celles développées et validées par l'AFSSA (l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) **[30]**.

III-2-1 La méthode de référence (Méthode de 4 boites) :

La méthode des 4 boites est la méthode officielle française dépistage des résidus d'antibiotiques dans la viande. Elle repose sur l'utilisation de quatre boites de pétri sur lesquelles sont déposés des disques de la viande à tester, elles contiennent divers milieux de culture et sont ensemencées avec différentes bactéries sensibles à plusieurs familles d'antibiotiques **[31], [32]**. Il s'agit d'une technique simple, à exécution relativement rapide et surtout pas chère **[33]**. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras **[31]**.

Technique :

La détection des résidus de substances à activité antibiotique nécessite l'application d'une technique de diffusion en gélose qui comporte :

- ✓ La préparation des boîtes du milieu nutritif;
- ✓ La préparation des souches de microorganismes utilisées pour les tests;

- ✓ L'ensemencement, par un microorganisme sensible aux substances à activité antibiotique, d'un milieu nutritif solide coulé en boîte de Pétri;
- ✓ Le dépôt, à la surface du milieu ensemencé, d'une **rondelle de muscle congelé**, suivi d'une incubation à la température optimale de développement du microorganisme-test **[34]**. Des disques témoins de concentration connus sont réalisés en parallèle que l'échantillon.
- ✓ Lecture : Les substances à activité antibiotique éventuellement présentes inhibent la croissance du microorganisme-test : il en résulte la formation d'une zone d'inhibition autour de l'échantillon. La lecture se fait par la mesure de la zone d'inhibition située entre le bord des fragments de tissu (ou les disques standards) et la limite de croissance. Une inhibition totale de la croissance avec une zone d'inhibition d'au moins 2 mm doit être considérée comme résultat positif; une zone d'inhibition de 1-2 mm comme résultat douteux, lorsque les témoins utilisés simultanément présentent des zones d'inhibition d'environ 6 mm **[35]**.

III-2-2 Le prémi® Test :

La société DSM propose le Prémi®Test : il permet de détecter les substances antimicrobiennes présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, le poisson, les œufs et même le foie. C'est un test à large spectre, qui permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande en moins de 4 heures, sur du jus de viande (extrait par pressage d'un morceau de viande) **[31,32, 34]**.

Principe *:*

Le premi®Test est une méthode à large spectre, son principe est basé sur l'inhibition de la croissance de *Bacilus stearothermophilus*, bactérie très sensible aux antibiotiques et aux sulfamides. Des spores standardisées sont incluses dans de la gélose additionnée de nutriments sélectionnés **[33, 32]**.

Technique (Figure 5):

Le premi®Test est appliqué sur du jus de viande déposé dans des tubes contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacilus stearothermophilus*. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus, le tube est incubé pendant 3heures à 64C°, puis la couleur est vérifiée. En cas de changement de couleur (apparition des formes végétatives qui entrainent l'acidification du milieu), le test est considéré comme négatif. A l'inverse, en

présence d'antibiotique (inhibition de la croissance), la couleur du test ne change pas **[6] (Figure 5)**.

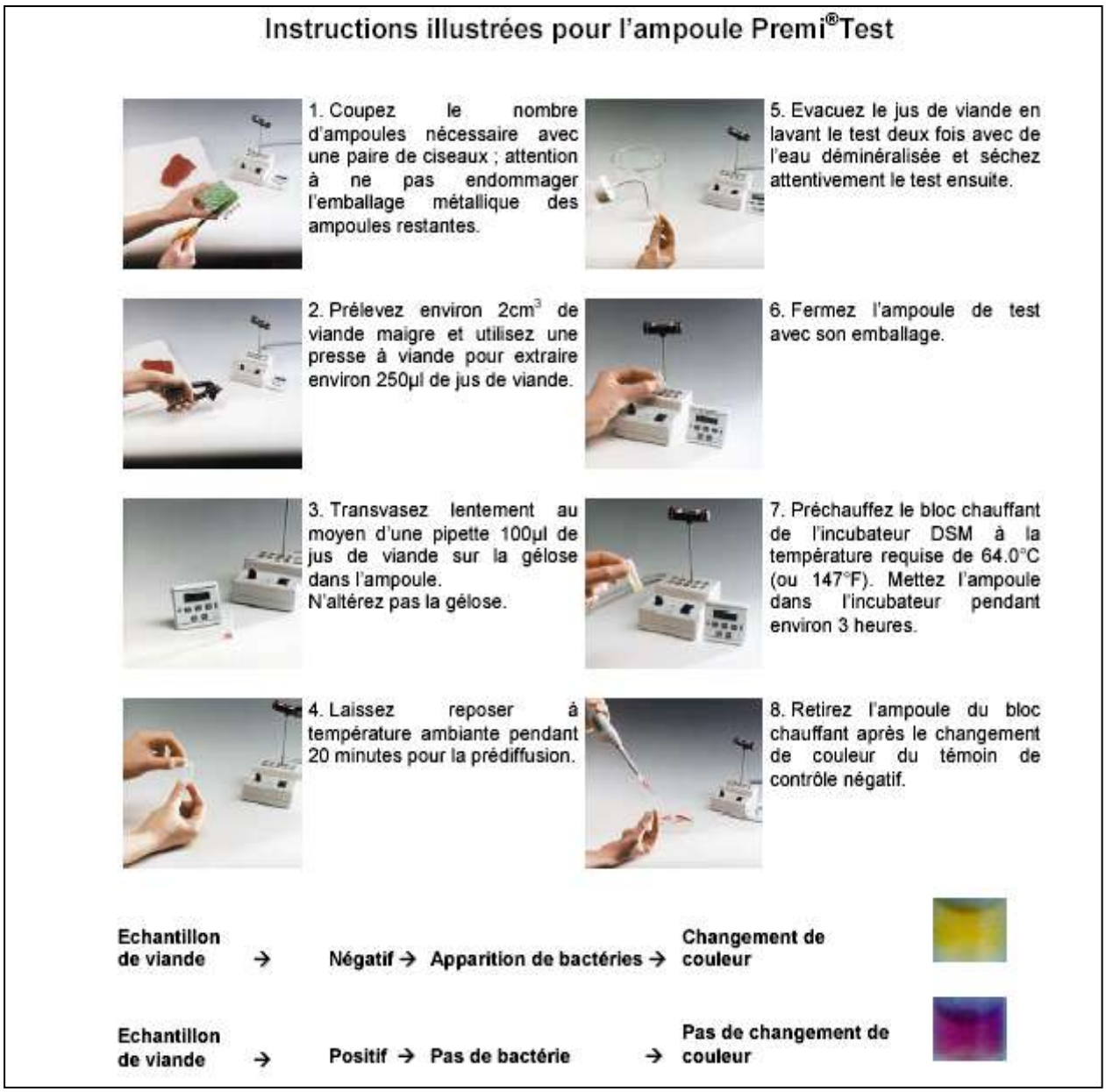


Figure 5: Technique du premi®Test [33].

III-2-3 La méthode STAR (Screening Test for Antibiotic Residues):

Le principe de la méthode STAR est le même que celui de la méthode des 4 boites, il s'agit d'une méthode microbiologique de dépistage des résidus d'antibiotiques basée sur l'utilisation des germes sensibles aux différents résidus d'antibiotiques. Elle est applicable sur des échantillons de muscle, de foie gras, de crevette ou de poissons **[31]**.

Les microorganismes test suivants sont utilisés **[31]** :

- ✓ **Boite Bs8 :** *Bacillus subtilis* cultivé à pH 8 pour les aminoglycosides;
- ✓ **Boite Kv8 :** *Kocuria varians ex. Micrococcus luteus* cultivé à pH 8 pour les Macrolides et béta-lactamines;
- ✓ **Boite Bc6 :** *Bacillus cereus* cultivé à pH 6 pour les Tétracyclines;
- ✓ **Boite Ec8 :** *Escherichia coli* cultivé à pH 8 pour les quinolones;
- ✓ **Boite Bst:** *Bacillus stearothermophilus* cultivé à pH 7.4 pour les Sulfamides et béta-lactamines.

III-3 Méthodes physico-chimiques :

Deux méthodes chromatographiques sont utilisées dans le dépistage et/ou le dosage des résidus d'antibiotiques dans les aliments : la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide à haute performance.

Dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la distribution des solutés entre deux phases non miscibles, l'une fixe dite **phase stationnaire**, l'autre en mouvement dite **phase mobile**. Alors que la phase mobile tend à entraîner les espèces à séparer dans son mouvement, la phase stationnaire tend à les retarder, d'autant plus fortement que les interactions mises en jeu sont plus intenses, nombreuses et plus énergétiques ; il en résulte que les analytes ont, pour la plupart, des vitesses de déplacement différentes et inférieures à celle de la phase mobile, d'où la notion de **rétention** et la possibilité de **séparations**. On parle d'une **chromatographie liquide** lorsque la phase mobile est constituée d'un solvant pur ou le plus souvent d'un mélange plus ou moins complexe de solvants de grande pureté **[36]**. La phase stationnaire peut être disposée **[37]**

- ✓ soit dans une colonne et la phase mobile percole celle-ci à débit (ou pression) constant, c'est la **chromatographie sur colonne (exemple HPLC)**.

- ✓ soit en couche mince sur un support plan (plaque de verre, film en plastique...) et la phase mobile se déplace par capillarité entrainant les solutés déposés à sa surface : c'est la **chromatographie planaire (exemple CCM)**.

La qualité de la séparation est régie par deux principaux paramètres **[37] :**

- ✓ la nature de la phase stationnaire;
- ✓ la nature de la phase mobile.

III-3-1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Figure III-2):

Couplé à un système d'injection des échantillons à analyser et à un système de détection en continu au sein d'un chromatographe, un tel système de séparation permet des analyses fines d'une grande qualité dans la mesure où les différents constituants des mélanges sont séparés avant d'être déterminés quantitativement **(Figure 6)**. Les techniques de chromatographie liquide sont en plein essor pour le contrôle en laboratoire grâce à la possibilité d'automatisation (injection, élution, nettoyage de la colonne, détection) **(Figure 6)**. L'utilisation assistée par ordinateur pour le traitement des données réduit le temps nécessaire pour le traitement d'un échantillon **[36]**.

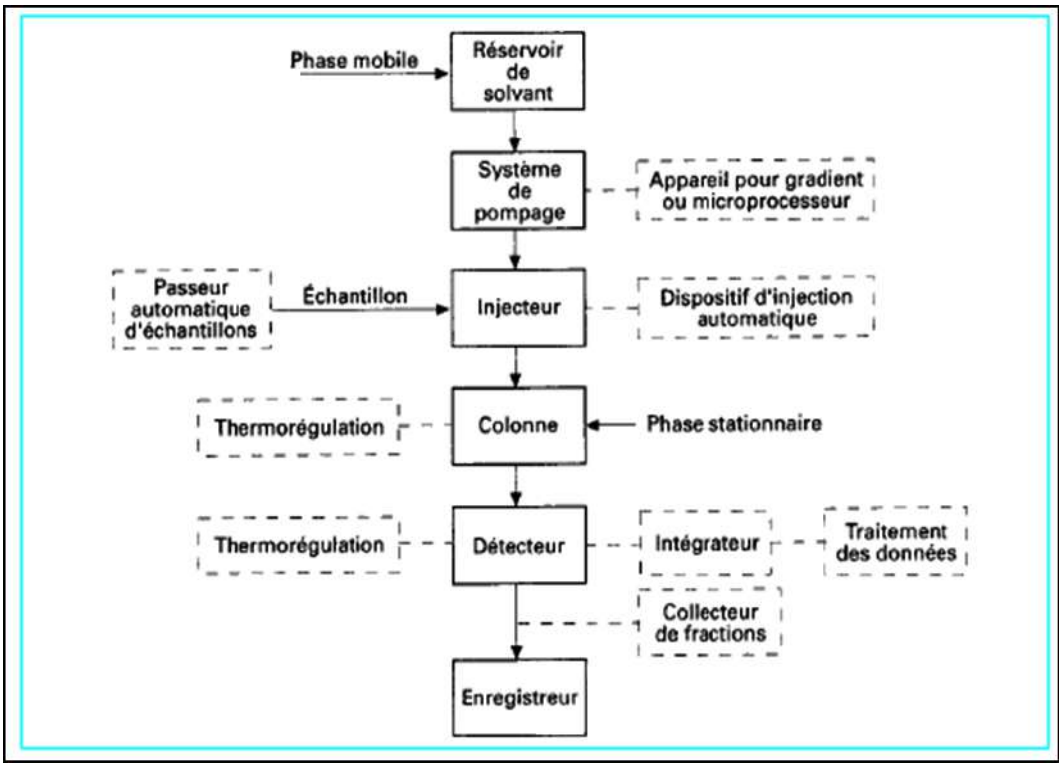


Figure 6: Schéma du principe d'un chromatographe en phase liquide [37].

L'utilisation des étalons de concentrations connus permet d'identifier et de quantifier les composants d'un échantillon **[38]** :

- ✓ L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétentions obtenus pour l'échantillon et pour les étalons. Le temps de rétention t_R est le temps d'élution au sommet du pic, mesuré à partir de l'injection.
- ✓ Le dosage s'effectue grâce à la mesure puis la comparaison de l'aire du pic d'élution de la substance de référence (étalon) à celle du produit à analyser.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été choisie comme méthode analytique pour confirmer la présence d'antibiotiques appartenant à plusieurs familles dans divers échantillons (viandes blanche et rouge, foie, rein...). ***Abiola. F.A et al, 2005*** **[39**] ont utilisé cette méthode pour confirmer la présence de tétracycline, de sulfamides, de nitrofuranes et de chloramphénicols dans le gésier et le foie de poulet. ***Jung-Bin Lee*** **et al, 2007 [40]** ont ciblé les molécules suivantes dans divers matrices: ampicilline, les tétracyclines (Chlorotétracycline, oxytétracycline, tétracycline), les macrolides (Tyrosine, érythromycine, spiramycine), Chloramphenicol et hygromycine.

Le traitement des échantillons passe par une phase d'extraction dont le protocole diffère d'une famille à une autre **[40]**.

L'HPLC peut être couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM-SM) pour détecter et quantifier les résidus d'antibiotiques dans divers matrices **[31**, **41, 42]**.

III-3-2-Chromatographie sur couche mince CCM :

Dans la CCM classique, la solution d'échantillon à analyser est déposée à l'aide d'un capillaire ou d'une seringue à une petite distance (1 cm en général) de l'extrémité de la couche. On peut donc parler d'une injection latérale à la différence de l'injection centrale réalisée sur colonne. Le volume déposé est très faible (1 à 5 µL). La tache (ou spot) ainsi obtenue doit être aussi circulaire et petite que possible. La plaque est ensuite placée dans une cuve à développement contenant le solvant (ou le mélange de solvants) constituant la phase mobile et saturée par ses vapeurs. La phase mobile monte par ascension capillaire entrainant ainsi l'échantillon déposé. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des interactions retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. La détection des substances est une opération distincte de la chromatographie et elle s'effectue

sur une couche séchée et débarrassée du solvant de développement par pulvérisation d'un réactif révélateur donnant des dérivés colorés avec les composants du mélange. L'identification s'effectue grâce à la comparaison des distances de migration obtenues pour les composants du produit à analyser et pour des étalons Co-migrés dans les mêmes conditions **[43]**.

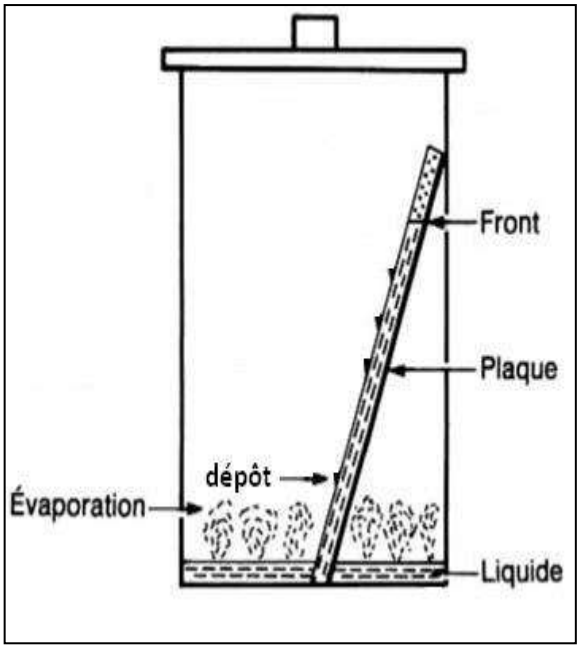


Figure 7: Dispositif de la chromatographie sur couche mince [43]

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire microbiologie (Direction de la Santé publique de Médéa).

IV-Matériels et méthodes :

IV-1 Matériels :

IV-1-1 Matériels biologique

IV-1-1-1 Echantillons :

Les échantillons de viandes blanches de poulet au nombre de 37 provenant des différentes communes de la wilaya de Médéa (Médéa, Berrouaguia, Béni Slimane,…) ont été prélevés au niveau des abattoirs et des points de vente. Mis dans des sacs en plastique stériles, les échantillons sont transportés dans des glacières.

Une fois au laboratoire, l'échantillon est d'abord identifié par un numéro attribué au moment de son enregistrement, puis stocké au congélateur jusqu'au moment de son analyse, cette opération de congélation obéit à la méthode de conservation préconisée.

IV-1-1-2 Souche bactériennes :

Une seule souche a été utilisée. Il s'agit de ***Micrococcus luteus*** (Réf : ATCC 9341). Cette souche a été aimablement fournie par le complexe SAIDAL de Médéa.

IV-1-2 Produits et milieux :

- ✓ **Milieux :**

  -Mueller et Hinton **(Annexe II)**

  -Gélose nutritive **(Annexe II)**

- ✓ **Produits chimiques et réactifs :**

  -Solution d'eau physiologique stérile (NaCl 0.9%).

  -Indicateur coloré : bleu de bromothymol.

  -Solutions de NaOH.

  -NaCl en poudre.

  -Disque d'antibiotiques pour antibiogrammes.

IV-1-3 Verrerie et petit matériel :

- ✓ Verrerie de laboratoire (flacons, fioles, bouteilles de roux, béchers, pipettes, tubes…).
- ✓ Petits matériels :
  - Boites de pétri.
  - Bec bunsen,
  - Anse de platine,
  - Emporte-pièce,
  - Bistouri,
  - Pince,
  - Micropipette variable (20-200µl),
  - Ecouvillon.

IV-1-4 Grand matériel :

- ✓ Réfrigérateurs et Congélateurs,
- ✓ Bain marie,
- ✓ Four pasteur,
- ✓ Étuve,
- ✓ Autoclave,
- ✓ Hautes microbiologiques.
- ✓ PH mètre.

IV-2 Méthodes :

IV-2-1 Sondage sur terrain :

Afin de savoir si l'éleveur algérien respecte la norme d'utilisation des antibiotiques au niveau de l'élevage, notre étude a commencé par un sondage sur terrain. Il s'agit d'un questionnaire réalisé auprès de deux niveaux :

- Au niveau du pharmacien grossiste,
- Au niveau du vétérinaire,

Les critères ciblés dans nos questionnaires sont :

- ✓ la nature des antibiotiques utilisés sur le terrain algérien ;
- ✓ la période d'utilisation ;

✓ Le respect du délai d'attente.

IV-2-2 Analyse microbiologique au laboratoire par la méthode en boite unique:

Notre partie expérimentale vise dans un premier volet le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des 37 échantillons de viande de poulet. La méthode utilisée est une technique microbiologique en boite unique mise au point par **Mazouz. I, 2012 [44]**. Le principe de cette méthode se résume au dépistage des résidus d'antibiotique en utilisant une seule boite d'un milieu approprié ensemencé par une seule souche multi-sensible. « Mueller et Hinton » a été sélectionné comme le milieu le plus favorable à la diffusion des antibiotiques à partir de leurs matrices. ***Micrococcus luteus*** a été aussi choisie comme souche multi-sensible. Apres application des matrices, l'incubation s'effectue à 37°C pendant 18 à 24H. La présence des résidus d'antibiotique se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition autours des disques des viandes testées. Selon la même étude **[44]**, le dépistage des résidus d'antibiotiques par ***M. luteus*** sur Mueller et Hinton ne semble pas donner de faux positifs, puisque les échantillons négatifs, les échantillons douteux ainsi que des échantillons témoins négatifs obtenus par un élevage de poulet sans antibiotiques ont été détectés comme négatifs. La qualité de la méthode a été déterminée au moyen des paramètres classiquement utilisés (la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive, la valeur prédictive négative), L'analyse des résultats confirme la très bonne sensibilité de la méthode (Se=0,85). La méthode est également spécifique (Sp=1) puisqu'elle permet d'identifier correctement les échantillons négatifs. Les valeurs prédictives positives (01) et négatives (0,93) apparaissent également satisfaisantes car elles laissent entendre que 100% et 93% des échantillons analysés comme positifs et négatifs respectivement par cette méthode sont confirmés réellement par la méthode de référence. Cette technique est considérée comme une méthode de présélection comparable au Prémitest **[44]**. C'est la raison pour laquelle, cette méthode a été choisie pour l'analyse pré sélective de nos échantillons. Ce ci nous a évité l'utilisation du Prémitest, technique importée et couteuse.

a-Réactivation des souches (Figure. 8):

Le but de cette partie est l'obtention d'une culture jeune en pleine phase de croissance. La technique se résume ainsi :

- Introduire une anse de platine stérile dans le tube de conservation jusqu'à la gélose inclinée, en évitant de toucher les parois, puis prélever une parcelle de la culture qui se trouve à la surface. Ensemencer dans une boite de Pétri de soja agar ou de gélose nutritive.
- Incuber à une température de 37°C pendant 24h à 48h.
- A partir des cultures obtenues après incubation. réaliser une suspension dans l'eau physiologique stérile.
- Introduire stérilement la suspension dans une bouteille de Roux contenant un milieu solide incliné (Soja Agar ou gélose nutritive).
- Incuber à 37°C pendant 24h à 48h.
- Introduire l'eau physiologique stérile dans la bouteille de Roux et récupérer la suspension riche en souche dans une fiole stérile qui constitue la solution mère.

b-Dénombrement (Figure 9) :

- Préparer 12 tubes de 9ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Procéder à la dilution 10 en 10 : à l'aide d'une pipette stérile prélever 1ml de la solution mère vers le premier tube de la solution d'eau physiologique. Agiter, puis transférer 1ml du 1^{er} tube vers le $2^{éme}$, puis vers le $3^{éme}$ tube et ainsi de suite jusqu'au la dernière dilution 10^{-12}.
- Introduire dans chaque boite de Pétri 0.1ml de chaque dilution (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-12}), utiliser 2 boites de Pétri pour chaque dilution.
- Introduire 15 à 20ml du milieu soja agar ou gélose nutritive maintenu en surfusion à 45 °C,
- Mélanger l'inoculum et le milieu de culture, en faisant des mouvements en huit,
- Incuber à 30-37°C pendant 24h à 48h,
- Comptage de colonies : Après incubation, sélectionner les boites présentant un nombre de colonie compris entre 30-300UFC.
- Prendre la moyenne arithmétique des dénombrements entre les deux essais pratiqués avec la même dilution.
- Calculer le nombre d'unité formant colonies par ml de la dilution.
- Multiplier par l'inverse de cette dilution pour avoir le nombre de bactérie par 1ml de la suspension mère.
- La charge finale de la solution mère en UFC/ml est estimée en faisant la moyenne des concentrations obtenues pour les différentes dilutions.

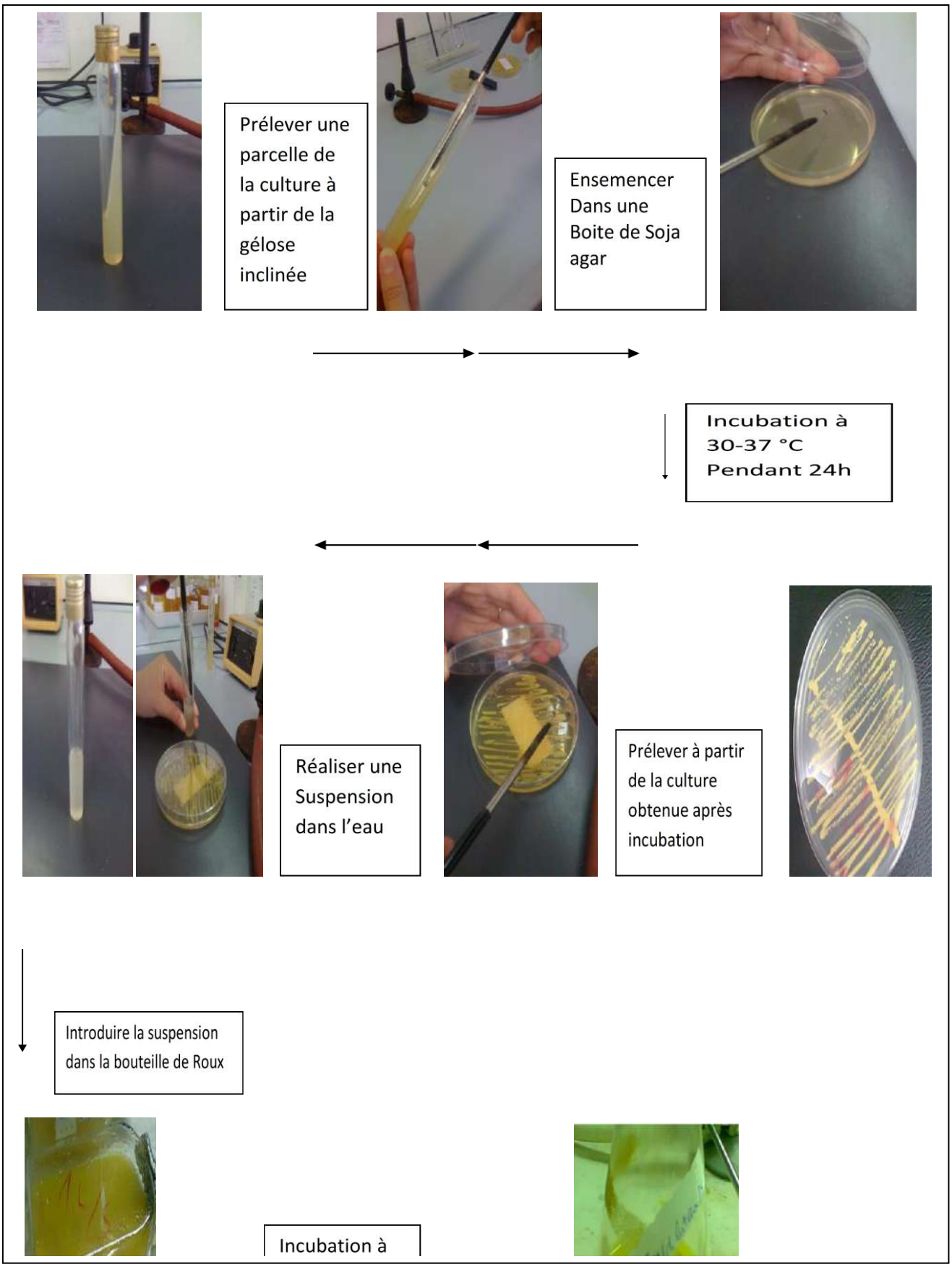


Figure 8: **Protocole de réactivation des souches.**

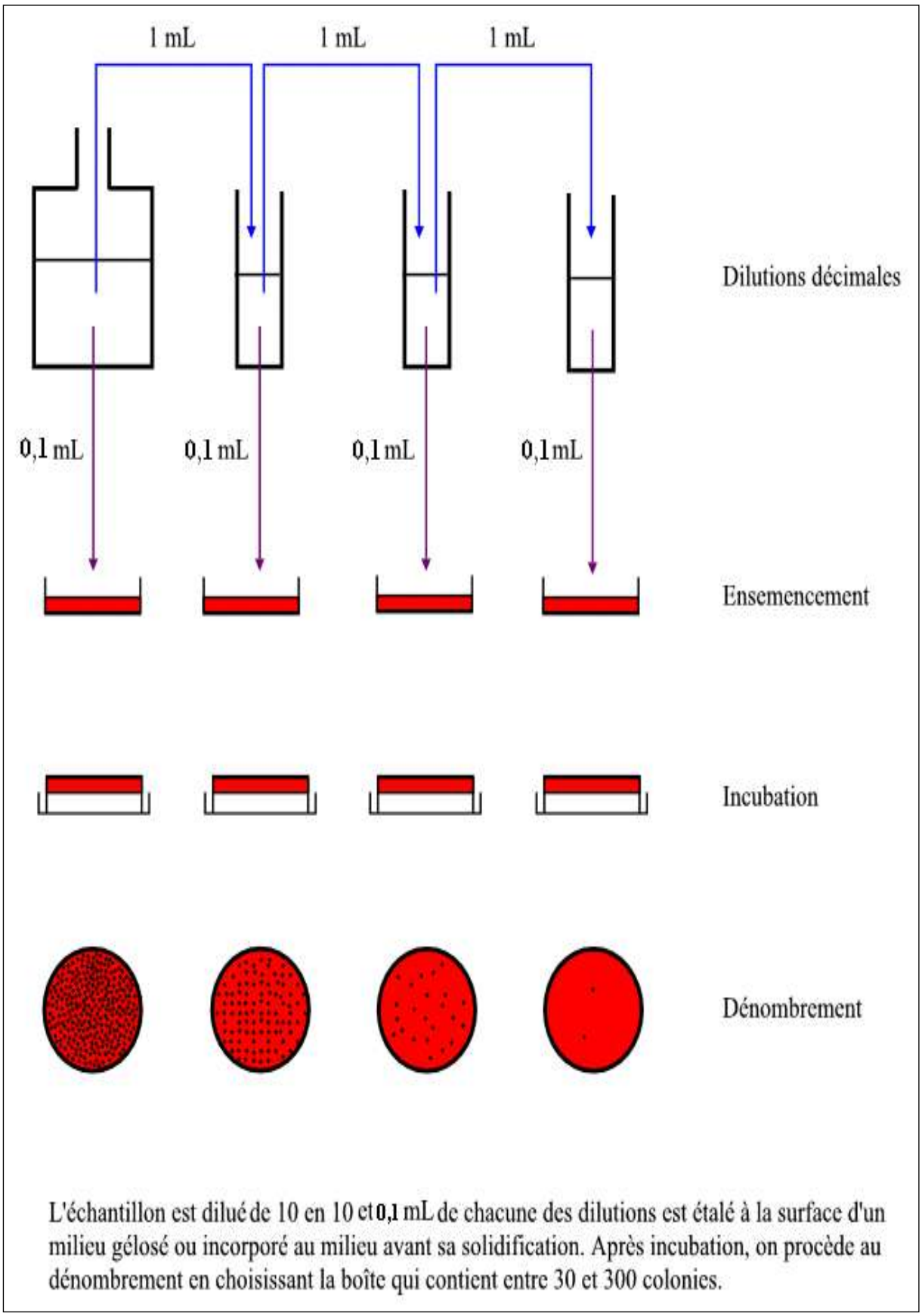


Figure 9 : Procédé générale du dénombrement.

c- Contrôle de la sensibilité de *M. luteus*:

Afin de s'assurer que la souche utilisée dans ce test microbiologique est suffisamment sensible pour détecter les résidus d'antibiotiques au niveau de nos échantillons, un antibiogramme a été exercé en milieu ‹‹ Mueller et Hinton ››. La méthode se résume ainsi :

- Couler le milieu ‹‹ Mueller et Hinton ›› dans les boites de Pétri et laisser solidifier,
- A l'aide d'écouvillons, réaliser un ensemencement en nappe de souche.
- Poser les disques d'antibiotique à la surface du milieu ensemencé,
- Incuber les boites à 37°C pendant 24h.
- Lecture: mesurer les diamètres des zones d'inhibition obtenues pour chaque antibiotique.
- Comparer les diamètres obtenus avec ceux d'un tableau de référence permettent de juger la sensibilité de la souche testée **(Tableau 3)**. Ce dernier est établi par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (SFM).

Tableau 2:**Tableau de référence pour la lecture de l'antibiogramme.**

	Charge du disque	Souche sensible (S) Si D (mm) est	Souche Résistante (R) Si D (mm) est
Pénicilline G	6 µg	≥29	<29
Ampicilline	10 µg	≥21	<21
Chlorotétracycline	30 µg	≥19	<19
Oxacilline	5 µg	≥20	<20
Amoxicilline	25 µg	≥21	<21
Erytromycine	15 µg	≥22	<22
Sulfamides	200 µg	≥17	<17
Floxacine	5 µg	≥22	<22
Streptomycine	500 µg	≥15	<15
Gentamycine	15µg	≥18	<18

d-**Technique de la méthode en boite unique (Figure 10):**

La technique se résume ainsi :

- A l'aide d'écouvillons, ensemencer la surface du milieu « Mueller et Hinton » par une suspension (10^5 à 10^6 UFC/ml) de la souche ***Micrococcus luteus***,
- Sortir l'échantillon du congélateur et le déposer sur une boite de Pétri stérile,
- Prélever sur chaque échantillon une carotte cylindrique de 9mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce stérile,
- A l'aide d'un bistouri, découper des disques d'échantillon de 2mm d'épaisseur,
- Placer les rondelles obtenues à la surface du milieu en utilisant une pince stérile. Prévoir deux rondelles pour chaque échantillon.
- Incuber les boites à 37 °C pendant 24h.
- Lecture : observer et mesurer les zones annulaires d'inhibition.

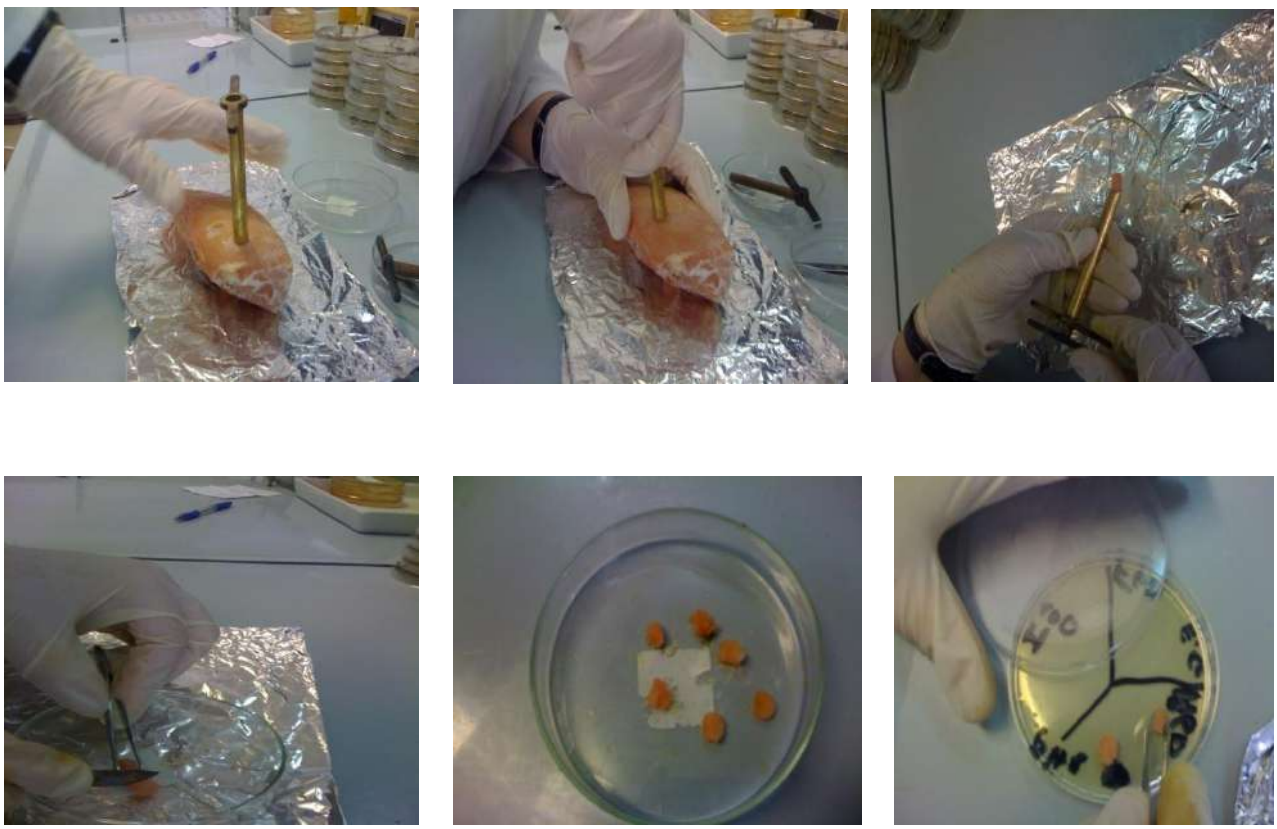


Figure 10: Technique de la méthode en boite unique.

IV-2-3 Mise au point de la méthode alternative:

Dans le but de mettre au point une méthode alternative moins couteuse, une technique en tube a été initiée sur les mêmes échantillons qui ont été déjà testé par la méthode en une seule boite (Méthode de dépistage de comparaison).

a-Historique et Principe :

IL s'agit d'un test miniaturisé en tube qui consiste à souche connue pour sa sensibilité aux antibiotiques avec un milieu de culture contenant un indicateur coloré. Le virage de la couleur du milieu est signe de croissance bactérienne. En présence d'un jus de viande contenant des résidus d'antibiotiques à une teneur supérieure à la LMR, la multiplication de la souche est limitée et la couleur du milieu ne change pas.

La sensibilité de la méthode dépend de l'indicateur de couleur utilisé. Le pouvoir inhibiteur d'un résidus d'antibiotique dans le jus d'un échantillon dépend de la charge du milieu en bactéries sensibles, de sa diffusion dans le milieu et du volume de jus de viande utilisé.

La mise au point de cette méthode alternative a été initiée par **Mazouz. I, 2012 [44]** une contribution au dépistage des résidus d'antibiotique a été réalisée au niveau de quelques échantillons de viande (rouge et blanche) positifs, pré-analysés par la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR. La faisabilité de la méthode a été démontrée dans les conditions opératoires suivantes :

- Le milieu Muller et Hinton a été choisi comme milieu solide favorable pour une bonne diffusion des antibiotiques. Il a été utilisé avec un volume de 1ml. La souche choisie est ***M. luteus*** (la souche la plus sensible). Cette dernière a été utilisée avec un inoculum bactérien minimal de l'ordre de 260.10^7 UFC/ml (concentration minimale en bactérie induisant un virage de la couleur du milieu). Le milieu ainsi que la souche choisis sont les optima adoptés par la même étude pour la méthode en boite unique.

- Le bleu de bromothymol est l'indicateur coloré le plus sensible. Ce dernier a été utilisé à une concentration de 0.04g/l.

- Le jus de l'échantillon a été appliqué à la surface avec un volume de 100µl après une neutralisation et une décontamination par une filtration stérilisante manuelle (en utilisant des filtres de 0.2µm).

- Le temps d'incubation est de 8 à 10H.

A la lumière de cette étude, nous allons terminer la mise au point de cette méthode soit :

- Avec le milieu Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et M luteus, et en utilisant un jus de viande neutralisé et décontaminé par une filtration stérilisante,

Ou

- Avec le milieu Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et ***M. luteus***, et en utilisant un jus de viande neutralisé. La décontamination par filtration stérilisante est dans ce cas remplacée par un facteur chimique inhibiteur additionné dans le milieu (NaCl). Ce dernier a pour but d'inhiber la croissance de la flore du jus de viande pendant l'incubation.

Les paramètres optimisés dans notre étude sont les suivants : la concentration en NaCl, la concentration en indicateur coloré, la charge du milieu, le volume du jus à déposer ainsi que la forme du dépôt (à la surface ou en profondeur).

b- Optimisation la concentration de NaCl :

Dans cette partie, nous avons choisi six concentrations de NaCl (10g/l, 20g/l, 30g/l, 40g/l, 50g/l et 60g/l). Notre but est de sélectionner la concentration qui donne une meilleure croissance de ***M luteus*** et qui inhibe totalement les germes de la viande. Pour cela, nous avons prévu deux séries de boites coulées par le milieu Mueller et Hinton additionné de NaCl à différentes concentrations. La technique se résume ainsi :

- A l'aide d'écouvillon, ensemencer la surface du milieu (Mueller et Hinton + NaCl à une concentration donnée) par une suspension mère de la souche.
- En parallèle, Sortir un échantillon négatif du congélateur. Ensemencer la surface du milieu (Mueller et Hinton + NaCl à une concentration donnée) par le jus de viande.
- Incuber les deux séries de boites à 37°C pendant 24h.

c-Optimisation la concentration de l'indicateur coloré :

Dans cette partie, nous avons choisi quatre concentrations de l'indicateur coloré : (0.01g/l, 0.02g/l, 0.03g/l, 0.04g/l). Notre but est de sélectionner la concentration qui donne une meilleure croissance de ***M. luteus*** avec un bon virage de la couleur du milieu. Pour cela, nous avons prévu une série de boites coulées par le milieu Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à différentes concentrations. Les milieux sont ensuite ensemencés par une suspension mère de ***M. luteus*** à l'aide d'un écouvillon.

- En parallèle, le milieu (Mueller et Hinton + NaCl à $C_{optimale}$) a été additionné de bleu de bromothymol à différentes concentrations (0,01 g/L, 0,02 g/L , 0,03 g/L, 0,04 g/L) . Notre but est de sélectionner la concentration qui donne une meilleure croissance de ***M. luteus*** avec un bon virage de la couleur du milieu et qui ne donne aucun virage de la couleur du milieu ensemencé par la flore de la viande. Pour cela, il faut prévoir pour chaque concentration 2 boites :

1) une boite est ensemencée avec ***Micrococcus luteus.***

2) une boite est ensemencée par à un jus de viande d'un échantillon négatif.

d-Détermination de l'inoculum bactérien minimal :

Le but de cette partie est la détermination du nombre minimal de bactéries qui induit un virage de la couleur des milieux : (Mueller et Hinton + Bleu de bromothymol) et (Mueller et Hinton à NaCl + Bleu de bromothymol). La démarche expérimentale est la suivante **(Figure.11)** :

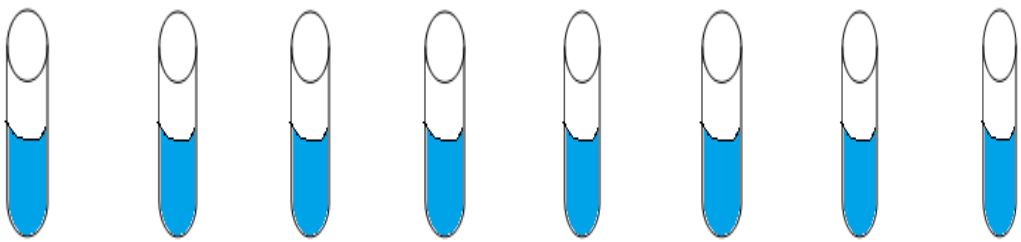
- A partir de la suspension mère de ***M. luteus*** de l'ordre 144.10^{12} UFC/ml, réaliser des dilutions (de 10 en 10) dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-12}.
- Remplir une série de tube en verre stériles de 5ml avec 1ml du milieu (Muller et Hinton + Bleu de bromothymol) (± NaCl) maintenu en surfusion (à 45°C).
- Ajouter 100µl de chaque dilution au milieu et laisser solidifier.
- Incuber à 37°C pendant 24h en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure.

e-Durée d'incubation des tubes:

Dans cette partie, notre but est de déterminer la marge de temps nécessaire pour obtenir un virage de la couleur du milieu. Pour cela, le suivi du virage de couleur du milieu à des intervalles d'une demi-heure durant l'expérience précédente (section d) nous permet donc de préciser la charge microbienne qui donne le virage le plus rapide et celle qui donne le virage le plus lent.

UFC/ml	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8} ---10^{-12}
M. luteus	144.10^{11}	144.10^{10}	144.10^{9}	144.10^{8}	144.10^{7}	144.10^{6}	144.10^{5}	144.10^{4}--144

100µl



UFC/ml								
M.luteus	144.10^{10}	144.10^{9}	144.10^{8}	144.10^{7}	144.10^{6}	144.10^{5}	144.10^{4}	144.10^{3}—14,4

Figure 11: Détermination de l'inoculum bactérien minimal: Protocol expérimental.

f-Test en présence d'un échantillon à la limite de la positivité (*Essai de faisabilité)*:

Dans cette partie, les dilutions ayant donné un virage de la couleur du milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl » ont été testées en présence de jus d'un échantillon à la limite de la positivité (ayant donné 1mm de zone annulaire d'inhibition par la méthode en boite unique). Nous avons réalisé une comparaison des temps de virage de la couleur du milieu en absence et en présence de ce jus neutralisé (**Annexe II)** et appliqués soit en profondeur (à raison de 100µl) ou en surface (à raison de 100µl ; 200µl et 300µl). Des témoins sans jus ont été préparés et incubés en parallèle. Un contrôle du virage de la couleur du milieu est indisponible à chaque 30min **(Figure 12)**.

Il faut signaler que le même échantillon neutralisé et décontaminé par une microfiltration stérilisante manuelle (par des filtres de 0.2µm et 0.45µm) a été aussi testé sur « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol ». Vu la difficulté rencontrée au cours de la filtration (nécessité d'une grande quantité d'échantillon), le test d'inhibition a été réalisé uniquement avec 100µl du jus de viande neutre et stérile déposé à la surface. Nous avons opté pour ce choix suite aux résultats obtenu pour le milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl ».

g-Test des échantillons négatifs et positifs :

A la lumière des résultats obtenus au cours du test de faisabilité, nous avons testé tous les échantillons (positifs et négatifs) dans les conditions suivantes **(Figure 13)** :

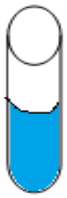
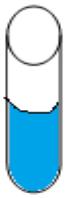
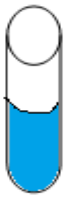
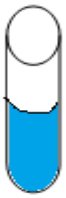
✓ Le milieu utilisé est « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl » aux concentrations optimales.

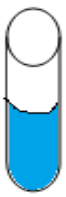
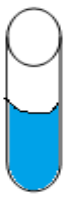
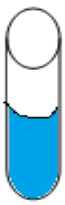
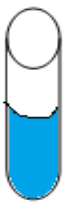
✓ Une série de 4 tubes a été préparé, contenant le milieu chargé d'un inoculum de 144.10^{10} UFC/ml à 144.10^{7} UFC/ml (milieux inoculés par 100µl des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4}). Le Jus de viande est neutralisé puis appliqué à la surface du milieu à raison de 100µl

✓ Une autre série de 2 tubes contenant le milieu chargé d'un inoculum de 144.10^{10} UFC/ml à 144.10^{9} UFC/ml (milieux inoculés par 100µl des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-2}). Le jus est neutralisé puis appliqué à la surface à raison de 200µl.

✓ Une troisième série de 4 témoins sans jus a été préparé, constituée de milieu chargé d'un inoculum de 144.10^{10} UFC/ml à 144.10^{7} UFC/ml (milieux inoculés par 100µl des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4}).

✓ Les trois gammes sont lancées en parallèle pour 5heures d'observation.

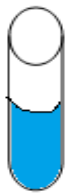
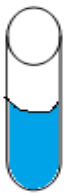
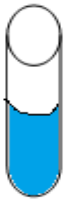
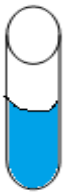
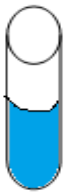
Milieu (Mueller et Hinton + Bleu de bromothymol et NaCl) inoculé et maintenu en surfusion à 45°C			
			
144.10^{10} UFC/ml	144.10^{9} UFC/ml	144.10^{8} UFC/ml	144.10^{7} UFC/ml
+ 100µl de jus de viande neutralisé			
Incubation à (37°C/ 24h) en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure.			

Milieu (Mueller et Hinton + Bleu de bromothymol et NaCl) inoculé et rapidement solidifié			
			
144.10^{10} UFC/ml	144.10^{9} UFC/ml	144.10^{8} UFC/ml	144.10^{7} UFC/ml
+ 100µl / 200µl ou 300µl de jus de viande neutralisé			
Incubation à (37°C/ 24h) en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure.			

Nb : Une série témoin sans jus de viande a été rélisée en parallele.

Figure 12 : Essai de faisabilité, cas du milieu

« Mueller et Hinton + Bleu de bromothymol et NaCl ».

<table>
<tr><td colspan="6">Milieu (Mueller et Hinton + Bleu de bromothymol et NaCl) inoculé
et rapidement solidifié</td></tr>
<tr><td>
144.10^{10}
UFC/ml</td><td>
144.10^{9}
UFC/ml</td><td>
144.10^{8}
UFC/ml</td><td>
144.10^{7}
UFC/ml</td><td>
144.10^{10}
UFC/ml</td><td>
144.10^{9}
UFC/ml</td></tr>
<tr><td colspan="4">+ 100µl de jus de viande neutralisé</td><td colspan="2">+ 200µl de jus de viande neutralisé</td></tr>
<tr><td colspan="6">Incubation à (37°C/ 5h) en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d’une demi-heure.</td></tr>
</table>

Nb : Une série témoin sans jus de viande a été rélisée en parallele.

Figure 13 : Test des échantillons positifs et négatifs.

V- Résultats et discussions :

V-1 Sondage sur terrain :

Le sondage auprès du pharmacien grossiste nous a donné une vue générale sur les molécules les plus consommées sur le terrain algérien :

- ✓ Les B-lactamines : Ampicilline, Amoxicilline, Pénicilline G et Oxacilline ;
- ✓ Les tétracyclines : Chlortétracycline et Tétracycline ;
- ✓ Les Sulfamides : Sulfathiazol ;
- ✓ Les aminosides : Gentamycine et Streptomycine ;
- ✓ Les macrolides : Erythromycine.
- ✓ Les quinolones : Enrofloxacine.

Auprès du vétérinaire, nous avons obtenu un schéma décrivant l'usage des antibiotiques pendant l'élevage aviaire destiné à la consommation depuis J_0 à J_{60} **(Figure 14)**.

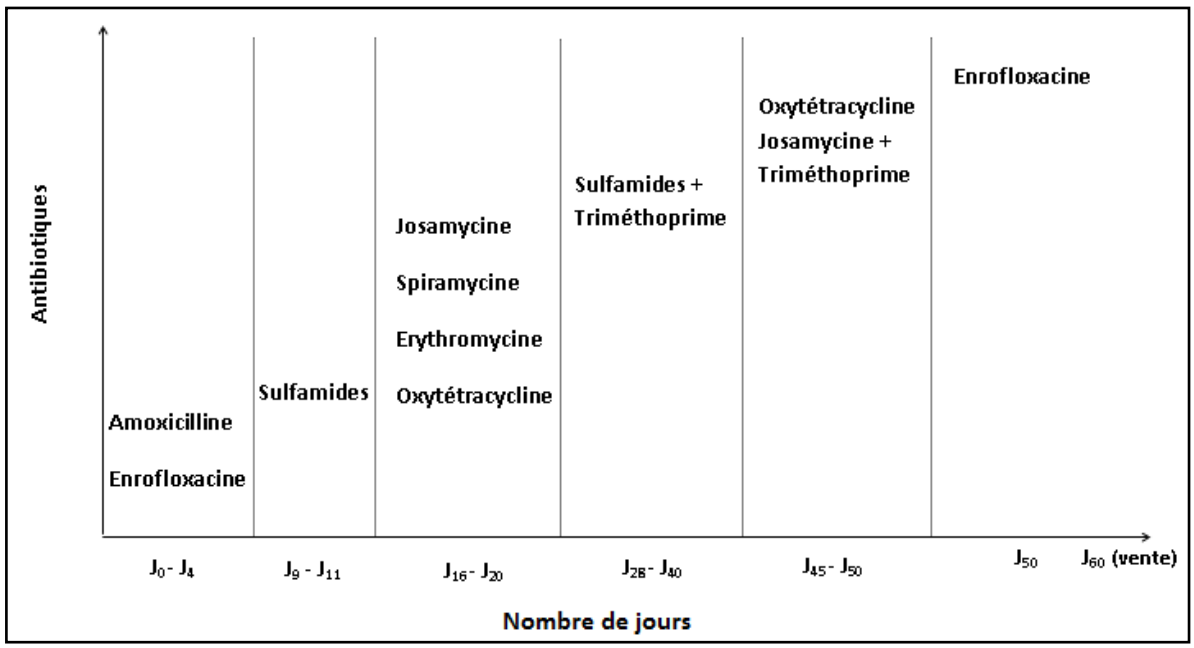


Figure 14: Exemple d'un schéma de gestion d'un élevage de poulet sur le plan antibiothérapie.

Il faut signaler les points suivants :

- Les vétérinaires ainsi que les éleveurs utilisent ce qui est disponible sur le marché algérien: à part l'Enrofloxacine (qui est un antibiotique à usage vétérinaire), toutes les autres molécules sont aussi à usage humain. Ce ci augmentent les risques de la sélections de mutants à fortes résistances qui passent de l'animale à l'être humain.

- Les antibiotiques sont surtout prescrits à titre préventifs que curatif ; car les locaux utilisés pour les élevages sont traditionnels, et ne répondent pas aux normes préconisés. Nous pouvons citer à titre d'exemples l'état des mûres qui permet une colonisation constantes des germes pathogènes qui résistent aux procédés de désinfections. Ce ci favorisent la réapparition des mêmes infections entres deux élevages successifs. Devant un tel problème, l'éleveur se trouve obligé d'utiliser les antibiotiques à titre préventif.
- Les antibiotiques sont aussi utilisés comme facteurs de croissance : dans notre pays l'antibiotique utilisé dans ce but est l'Enrofloxacine.
- Devant le risque des infections et l'instabilité des prix du poulet de chair, l'éleveur se trouve dans l'obligation de vendre son produit à n'importe quel moment de la phase de finition de son élevage (la dernière quinzaine). Ce ci implique le non respect du délai d'attente et donc la grande possibilité d'avoir un produit dont la teneur en résidus d'antibiotiques est supérieur à la LMR.

V-2 Analyse microbiologique au laboratoire par la méthode en boite unique:

V-2-1 Réactivation et dénombrement :

Suite à la réactivation de la souche nous avons obtenu une suspension mère dense en ***M. luteus*** dont le dénombrement a révélé une teneur de 144.10^{12} UFC/ml.

V-2-2 Contrôle de la sensibilité de *M. luteus* :

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés sur la **Figure 15**.



Figure 15 : Zones d'inhibitions obtenues pour *Micrococcus luteus.*

Les diamètres des zones d'inhibition **(Tableau 4)** obtenus pour la souche en contact avec les différents disques antibiotiques sont comparés avec ceux du tableau de lecture de référence (**Tableau 3**, Partie Matériels et Méthode). La souche ***Micrococcus luteus*** est sensible à tous les antibiotiques testés.

Tableau 3 : **Résultats de l'antibiogramme de *M. luteus* (quelques exemples de zones d'inhibition).**

	Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)
Pénicilline	10µg	43
Ampicilline	10 µg	40
Chlorotétracycline	30 µg	33
Oxacilline	5 µg	30
Amoxicilline	25 µg	43
Erythromycine	15 µg	29
Clindamycin**e**	30µg	22
Floxacine	5 µg	30
Streptomycine	30 µg	29
Gentamycine	15µg	26

V-2-3 Résultats de l'analyse par la méthode en boite unique:

Après incubation, la présence des résidus d'antibiotiques se manifeste par la formation de zones d'inhibition au tour de l'échantillon suspect. La lecture se fait par la mesure de la zone d'inhibition située entre le bord des fragments de tissu et la limite de la croissance. A la lumière des travaux de **Mazouz, I, 2012 [44]**, nous rappelons que le dépistage des résidus d'antibiotiques par cette méthode de présélection ne semble pas donner de faux positifs, puisque les échantillons négatifs, les échantillons douteux ainsi que des échantillons témoins négatifs obtenus par un élevage de poulet sans antibiotiques ont été détectés comme négatifs. Pour cela, toute croissance avec une zone d'inhibition, quelque soit sa dimension, doit être considérée comme résultat positif.

Nous représentons sur la **Figure 16** des exemples des zones d'inhibition obtenues pour les échantillons analysés (**Annexe III**).



Figure 16: Résultats des échantillons analysés après incubation.

L'analyse des 37 échantillons de muscle de poulet par la méthode en boite unique a révélé les résultats représentés sur le **Tableau 5** et la **Figure 17** .

Tableau 4 : **Nombre et pourcentage des échantillons positifs et négatifs analysés par la méthode en boite unique.**

Echantillon	Muscle de poulet
Echantillons positifs	15(40,54%)
Echantillons négatifs	22(59.46%)

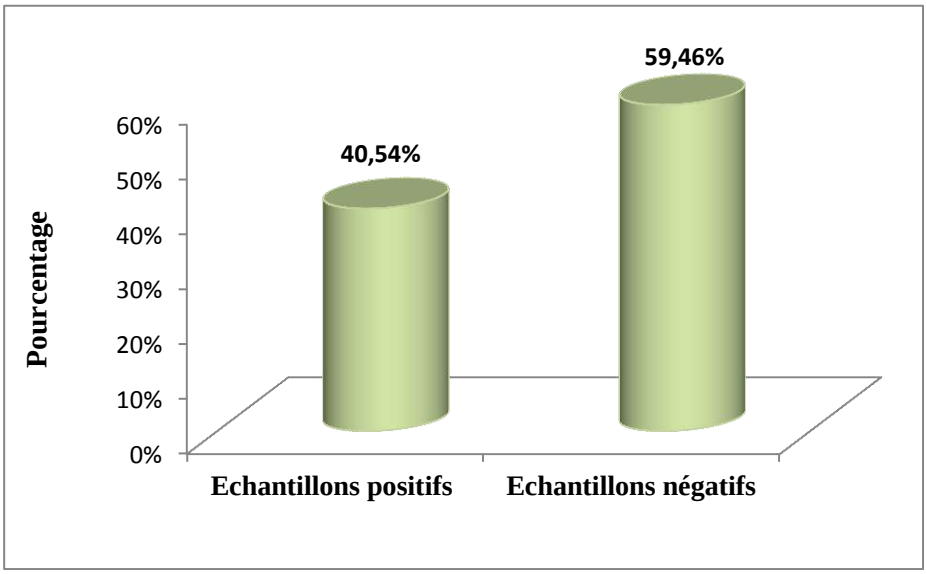


Figure 17 : Résultat du dépistage globale des résidus d'antibiotiques par la méthode en boite unique.

Nous constatons, que le pourcentage des échantillons positifs est très proche de celui des échantillons négatifs. Presque la moitié des échantillons de Poulet présentent des résidus d'antibiotiques ce qui constitue un pourcentage alarmant **(Figure 17)**. Ce ci peut être expliqué par la période des prélèvements qui coïncide avec des événements religieux de notre société (Ramadan, l'Aïd, des fêtes de circoncision pendant le mois de Ramadan) et des événements sociaux (les vacances de l'été et les fêtes de mariage). Il ya eu donc une demande excessive en viande pendant cette période. Comme le prix de la viande rouge est non abordable, le consommateur algérien se dirige vers la viande blanche. L'augmentation de la demande est une occasion pour nos éleveurs afin d'augmenter leurs prix (mais qui reste inférieur à celui de la viande rouge) et vendre leurs produits avant la fin de la phase de finition des élevages. La conséquence est donc un pourcentage alarmant de viande présentant au taux de résidus supérieur à la LMR et donc impropre à la consommation.

En Algérie ; plusieurs études ont ciblé la fraude dans la production aviaire vis-à-vis de la présence de résidus d'antimicrobiens ; le taux de positivité est apparemment variable d'une étude à une autre. Il est de **[44]** : 3.33% dans la région d'Alger **[45]**, 65.7% dans la région d'El-Taref **[46**], 28.85% dans la région de la Kabylie **[47]** , 29.03% **[48]**et 22.10%**[44].** dans les wilayas du centre Algérien. En dehors de notre pays, une étude réalisée à Dakar, (**Châtaigner. B et Stevens.A)[49],** ont trouvé 3% de positifs chez les poulets .

V-3 Mise au point de la méthode alternative (Méthode en tubes):

Il s'agit d'une méthode qui repose sur l'inhibition du virage de la couleur d'un milieu ensemencé d'une souche multi-sensible en contact du jus d'un échantillon porteur de résidus d'antibiotique à des concentrations supérieurs à la LMR. Il faut rappeler que les essais d'optimisations concernent deux procédés :

1- Un procédé avec filtration stérilisante des jus d'échantillons dont le but est l'élimination de la flore endogène de la viande. Dans ce cas nous utilisons un milieu non sélectif : le Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol qui est mis en contact avec la souche test : ***M. luteus*** et un jus de viande stérile.

2- Un procédé sans traitement de l'échantillon à déposer. Dans ce cas nous utilisons un milieu sélectif : le Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl qui est mis en contact avec la souche test : ***M. luteus*** halophile et un jus de viande non stérile dont la flore endogène est éliminée par le NaCl.

Il faut signaler que les paramètres à optimiser avant la mise en contact du milieu avec les jus d'échantillons sont les suivants :

1- La concentration en bleu de bromothymol, et la charge minimale de l'inoculum induisant un virage de la couleur du milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol » (Procédé 1),

2- La concentration en NaCL, en de bromothymol, et la charge minimale de l'inoculum induisant un virage de la couleur du milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl» (Procédé 2) ;

Il nous reste par la suite les paramètres optimaux à déduire lors des essais d'inhibition (test en contact avec les jus d'échantillons) et qui sont : le volume ainsi que la forme du dépôt, et la durée d'incubation nécessaire pour tirer un résultat conforme.

V-3-1 Optimisations préliminaires sur le milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol » :

Dans cette partie, nous avons utilisé le milieu Muller et Hinton, le milieu favorable à une bonne diffusion des antibiotiques selon la méthode en une seule boite. Ce milieu est additionné d'un indicateur coloré afin de détecter la croissance bactérienne par simple virage de la couleur du milieu.

V-3-1-1 Optimisation la concentration de l'indicateur coloré :

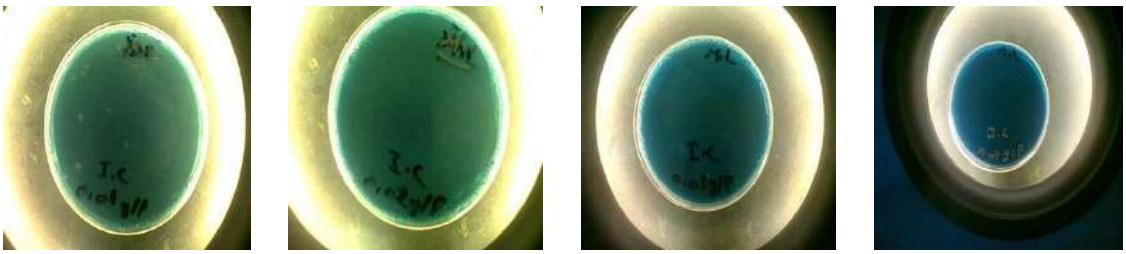
Les résultats obtenus après incubation (en comparaison avec l'état initial avant incubation) sont représentés sur la **Figure 18**.

Le virage de la couleur du milieu du bleu au vert est plus net en diminuant la concentration de l'indicateur de couleur. En fait, l'indicateur de couleur joue aussi à une concentration élevée un rôle d'un facteur limitant la croissance de ***M. luteus***, ce qui limite le virage de la couleur du milieu. Pour cela, nous optons pour la concentration qui donne une meilleure croissance avec un bon virage du milieu (cas de 0,01g/l et 0,02g/l). Nous terminons donc la suite de notre travail avec la plus basse concentration en Bleu de bromothymol.

Avant incubation :



Après incubation :



Croissance ++	**Croissance ++**	**Croissance +**	**Quelques colonies**
Virage au vert	**Virage au vert**	**Virage au bleu-vert**	**Bleu**

Figure 18 : **Aspect du milieu Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à différentes concentration avant et après incubation.**

V-3-1-2 Détermination de la charge minimale en inoculum:

Le milieu additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l donne un virage nette de la couleur du milieu jusqu'au tube ensemencé à partir de la dilution de 10^{-4} ce qui correspond à un inoculum minimal de 144.10^{7} UFC/ml **(Figure 19)**.

Le virage de la couleur du milieu commence à partir de

- 30 min (vert pistache +jaune) pour le milieu ensemencé à partir de la dilution de 10^{-1} ce qui correspond à un inoculum de 144.10^{10} UFC/ml;
- 1H 30min (vert + vert pistache) à 2H (Vert + jaune) pour le milieu ensemencé à partir de la dilution de 10^{-2} ce qui correspond à un inoculum de 144.10^{9} UFC/ml;
- A partir de 3H pour les milieux ensemencés à partir de la dilution de 10^{-3} (144.10^{8} UFC/ml) et 10^{-4} **(**144.10^{7} UFC/ml).

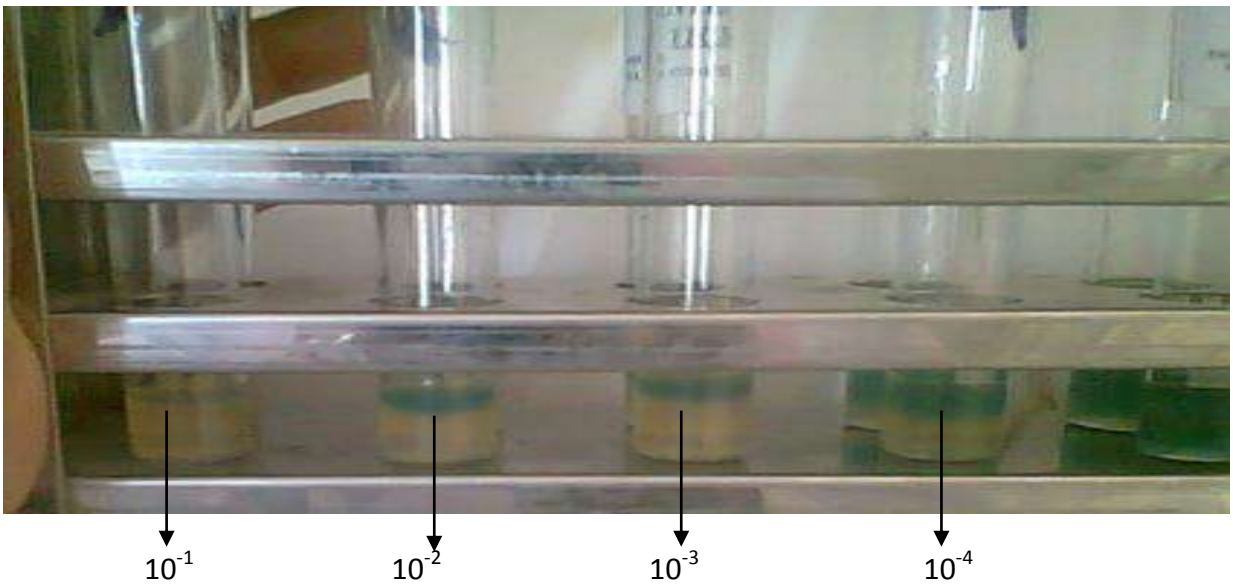


Figure 19 : Virage de la couleur du milieu additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l après 24H d'incubation.

V-3-2 Optimisations préliminaires sur le milieu « Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol et de NaCl» :

V-3-2-1 Optimisation la concentration de NaCl :

Il faut rappeler que nous avons suivi la croissance de ***M. luteus*** ainsi que la flore d'un jus de viande en présence d'un agent inhibiteur dans le milieu Mueller et Hinton. Les résultats obtenus sur Mueller et Hinton additionné de NaCl à des concentrations variables sont représentés sur le **Tableau 6** et la **Figure 20**.

Tableau 5 : observation de la croissance de *M. luteus* et la flore d'un jus de viande sur le milieu « Mueller et Hinton + NaCl ».

Concentration de NaCl	***M. luteus***	**Jus de viande**
10g/l	Croissance	Croissance
20g/l	Croissance	Croissance
30g/l	Croissance	Croissance
40g/l	Croissance	-
50g/l	Croissance	-
60g/l	Croissance	-



Figure 20 : Croissance de *M. luteus* et la flore d'un jus de viande sur le milieu « Mueller et Hinton + NaCl ». C $_{NaCl}$: 30g/l-60g/l.

Pour inhiber la croissance de la flore du jus de viande toute en gardant une bonne croissance de ***M. luteus***, nous avons choisi la concentration en NaCl de 50g/l comme optimale.

V-3-2-2 Optimisation la concentration de l'indicateur coloré :

Les résultats obtenus après incubation sont représentés sur le **Tableau 7** et la **Figure 21**.

Tableau 6 : **Observations notées concernant la croissance ainsi que virage de la couleur du milieu Mueller et Hinton additionné de NaCl et de bleu de bromothymol.**

C (NaCl)	**50g/l**	**50g/l**	**50g/l**	**50g/l**
C (I.C)	0.0125g/l	0.02g/l	0.03g/l	0.04g/l
M. Luteus	Bonne croissance Virage au vert	Quelques colonies Virage au bleu vert	- Bleu	- Bleu
Jus de viande	- (Bleu)	- (Bleu)	- (Bleu)	- (Bleu)



Figure 21 : Aspect du milieu Mueller et Hinton additionné de NaCl et de bleu de bromothymol à différentes concentrations après incubation.

Il faut signaler que les indicateurs de couleurs dans les milieux permettent de détecter des croissances bactériennes très faibles par simple virage de la couleur du milieu sans apparition nette des colonies. L'effet du NaCl sur la croissance de la flore du jus de viande est une fois de plus confirmé en présence d'un indicateur coloré : nous n'avons aucun virage de la couleur des milieux ensemencés par le jus de viande. Concernant la série de boites ensemencées par ***M. luteus***, Le virage de la couleur du milieu du bleu au vert n'est net qu'à une concentration en bleu de bromothymol de 0,01g/l. En fait, la croissance de ***M. luteus*** en présence de NaCl n'est pas aussi bonne qu'à son absence ce qui limite le virage de la couleur du milieu par comparaison au milieu exempte de NaCL. Pour cela, nous optons pour la concentration qui donne une meilleure croissance de ***M. luteus*** avec un bon virage du milieu (cas de 0,01g/l).

V-3-2-3 Détermination de la charge minimale en inoculum:

Le milieu additionné de bleu de bromothymol à 0,01 g/l et de NaCl à 50g/l donne un virage nette de la couleur du milieu jusqu'au tube ensemencé à partir de la dilution de 10^{-4} ce qui correspond à un inoculum minimal de 144.10^{7}UFC/ml **(Figure 22)**.

Le virage de la couleur du milieu commence à partir de

- 30 min (bleu vert+ Jaune) pour le milieu ensemencé à partir de la dilution de 10^{-1} ce qui correspond à un inoculum de 144.10^{10} UFC/ml;
- 1H 30min (vert+jaune) pour le milieu ensemencé à partir de la dilution de 10^{-2} ce qui correspond à un inoculum de 144.10^{9} UFC/ml;

- A partir de 3H pour les milieux ensemencés à partir de la dilution de 10^{-3} (144.10^{8} UFC/ml) et 10^{-4} **(**144.10^{7} UFC/ml) (un virage très léger au bleu vert).

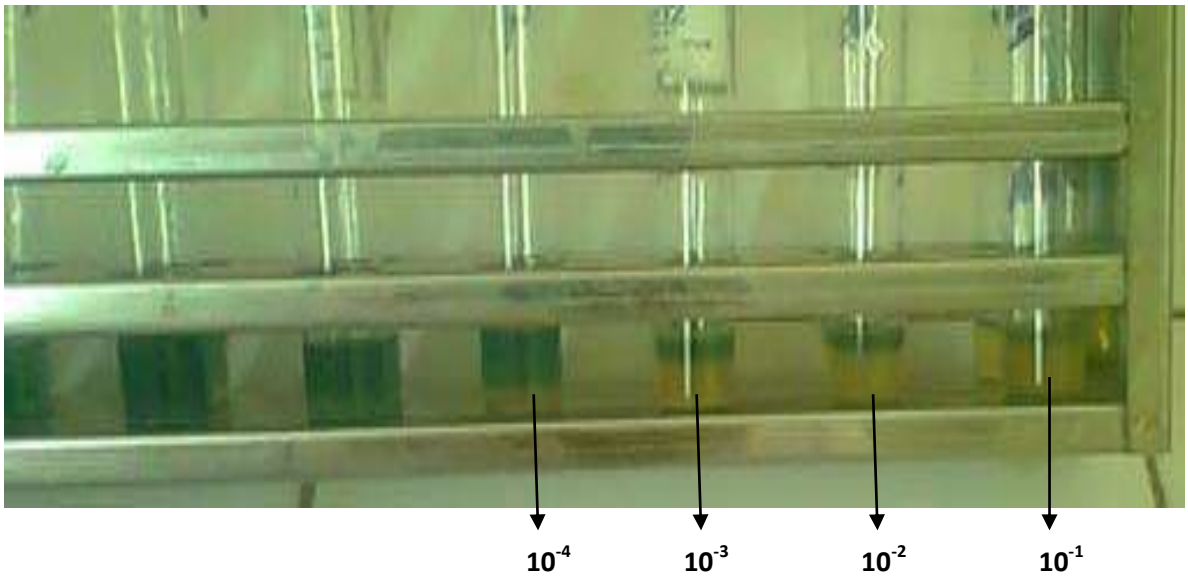


Figure 22 : Virage de la couleur du milieu additionné de Na Cl à 50g/l et de bleu de bromothymol à 0,01g/l après 24H d'incubation.

V-3-3 Test en présence d'un échantillon à la limite de la positivité (*Essai de faisabilité)*:

Nous avons réalisé une comparaison des temps de virage de la couleur du milieu en absence et en présence d'un échantillon à la limite de la positivité (1mm de zone annulaire d'inhibition) et ce pour les tubes ensemencés avec 100µL des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4} c.à.d., les tubes ayant donné un virage de la couleur du milieu en présence de ***M. luteus*** à différentes concentrations (144.10^{10} UFC/ml-144.10^{7} UFC/ml). Cet essai a été réalisé avec le milieu Mueller et Hinton additionné de NaCl (50g/l) et de bleu de bromothymol à 0,01g/l. Les jus d'échantillons sont neutralisés avant leurs dépôts soit à la surface ou en profondeur. Les volumes déposés varient entre 100µl et 300µl.

A partir des résultats, nous pouvons tirer les remarques suivantes :

- Le milieu dont la charge est de 144 10^{10} donne un virage de sa couleur à 45min à un volume du jus de 100µL. Le temps de virage est légèrement supérieur à celui du témoin sans échantillon (30min, Cf. section V-3-2-3). L'échantillon est donc qualifié « à la limite de la

positivité ». Pour des volumes supérieurs à 100µl (200µl et 300µl), nous avons une meilleur inhibition de la croissance de ***M luteus*** : le virage ne commence qu'à partir de 2h pour 200µl (>>>30min) et l'inhibition est totale à 300µl jusqu'à 2H 30min (arrêt de l'observation).L'échantillon est donc qualifié de Positif.

- Le milieu dont la charge est de 144 10^9donne un virage + ou – net entre (2h et 2H30) à un volume du jus de 100µl. Le temps de virage est légèrement supérieur à celui du témoin sans échantillon (1H 30, Cf. section V-3-2-3). L'Échantillon est « à la limite de la positivité ». Pour des volumes supérieurs à 100µl (200µl et 300µl), nous avons une meilleur inhibition de la croissance de ***M luteus*** : le virage est non significatif à partir de 2h pour 200µl (Couleur Bleu verte) et l'inhibition est totale à 300µl jusqu'à 2H 30min (arrêt de l'observation).L'échantillon est donc qualifié de Positif.

- Le milieu dont la charge est de 144 10^8 donne à peine un virage au bleu vert à 3h sans échantillon (Cf. section V-3-2-3). Par contre nous avons une inhibition avec un échantillon à la limite de la positivité. Cette manipulation nécessite un suivie pour situer exactement le temps de virage nette de cette dilution en absence d'échantillon. Et aussi de situer le degré d'inhibition de l'échantillon à cette dilution.

- Les résultats obtenus pour les échantillons appliqués en profondeur (100µL de jus) sont identiques avec ceux des échantillons appliqués à la surface (même volume, 100µl). L'application à la surface est donc choisie, car cette dernière ne modifie pas la concentration en NaCl du milieu et assure donc une bonne inhibition de la flore de la viande.

- Bien que nous ayons une bonne inhibition à 200 µl et à 300 µl de jus d'échantillons quelque soit la charge du milieu en ***M. luteus***, nous n'avons avons un grand risque d'obtention de faux positif (négatifs qui sont considérés comme positifs).

- **Conclusion :** La faisabilité du procédé est donc prouvée. Nous terminons donc l'essai d'inhibition avec le reste des échantillons positifs et négatifs dans les conditions suivantes :
  - ✓ Une série de milieux inoculés de 144 10^{10} à 144 10^7 UFC/ml avec 100µl de dépôt à la surface,
  - ✓ Deux milieux inoculés de 144 10^{10} et 144 10^9 UFC/ml avec 200µl de dépôt à la surface.

Il faut signaler que le même échantillon, neutralisé, décontaminé par une microfiltration stérilisante a été déposé à 100µl en surface d'un milieu Muller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l ayant une charge de 144 10^{10} à 144 10^{7}UFC/ml. Ce milieu a donné un résultat similaire que celui du Muller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l et de NaCl à 50g/l dans des conditions similaire (100µl de jus neutralisé et déposé à la surface). Vu la difficulté rencontrée au cours de la filtration (nécessité d'une grande quantité d'échantillon et la non disponibilité des filtres stérilisants) nous avons préconisé de terminer l'optimisation sur le milieu Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l et de NaCl à 50g/l.

V-3-4 Test des échantillons négatifs et positifs :

Dans cette partie, nous avons testé le pouvoir inhibiteur de 14 échantillons positifs et 12 échantillons négatifs (déjà analysés par la méthode en boite unique). L'objectif est de choisir parmi la gamme déjà sélectionnée (au cours de test de faisabilité) à quelle concentration de ***M. luteus*** et à quelle quantité d'échantillon déposé en surface il faut travailler pour avoir un résultat le plus similaire possible à celui de la méthode en boite unique.

Pour plus de crédibilité des résultats, nous avons lancé en parallèle une série de « témoins sans échantillons » dans les mêmes conditions avec les tests en présence d'échantillons.

Nous signalons, pour les échantillons négatifs les remarques suivantes :

❖ Pour la série testée avec un volume d'essai égale à 100µl :

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-1} (144 10^{10} UFC/ml): Nous avons :

- 6 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (30min) = 6 échantillons négatifs ;
- 6 tubes dont la couleur des milieux restent bleus (inhibition) et donnant un virage à des temps supérieurs que celui du témoin (sans échantillon)= 6 échantillons faux positifs ;

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-2} (144 10^{9} UFC/ml): Nous avons :

- 9 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (1H45min à 2H30min)= 9 échantillons négatifs ;

- 3 tubes dont la couleur des milieux restent bleu verts (inhibition) et ne donnant aucun virage à des temps supérieurs = 3 échantillons faux positifs;

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-3} (144 10^{8} UFC/ml) et 10^{-4} (144 10^{7} UFC/ml): Nous avons :

- 6 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (1H45min à 2H30min)= 6 échantillons négatifs ;
- 6 tubes dont la couleur des milieux restent bleu verts (inhibition) et ne donnant aucun virage à des temps supérieurs = 6 échantillons faux positifs.

❖ Pour la série testée avec un volume d'essai égale à 200µl :

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-1} (144 10^{10} UFC/ml): Nous avons :

- 4 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (30min) = 4 échantillons négatifs ;
- 8 tubes dont la couleur des milieux restent bleus (inhibition) et donnant un virage à des temps supérieurs que celui du témoin (sans échantillon)= 8 échantillons faux positifs ;

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-2} (144 10^{9} UFC/ml): Nous avons :

- 8-9 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (1H45min à 2H30min)= 8-9 échantillons négatifs;
- 3-4 tubes dont la couleur des milieux restent bleu verts (inhibition) et ne donnant aucun virage à des temps supérieurs = 3-4 échantillons faux positifs;

Nous signalons, pour les échantillons positifs, les remarques suivantes :

❖ Pour la série testée avec un volume d'essai égale à 100µl :

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-1} (144 10^{10} UFC/ml): Nous avons :

- 2 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (30min) mais dont la couleur s'est rétablis juste après en Bleu ou en Bleu vert = 2 échantillons douteux;

- 12 tubes dont la couleur des milieux restent bleus (inhibition) et donnant un virage à des temps largement supérieurs que celui du témoin (sans échantillon)= 12 échantillons positifs ;

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-2} (144 10^{9} UFC/ml): Nous avons :

- 14 tubes dont la couleur des milieux restent bleu ou bleu verts (inhibition) et dont la majorité ne donne aucun virage à des temps supérieurs = 14 échantillons positifs;

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-3} (144 10^{8} UFC/ml) et 10^{-4} (144 10^{7} UFC/ml): Nous avons :

- 14 tubes dont la couleur des milieux restent bleu (inhibition) et ne donnant aucun virage à des temps supérieurs = 14 échantillons positifs;

*Pour la série testée avec un volume d'essai égale à 200µl :

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-1} (144 10^{10} UFC/ml): Nous avons :

- 2 tubes donnant un virage à un temps similaire que celui du témoin sans échantillon (30min) mais dont la couleur s'est rétablis juste après en Bleu ou en Bleu vert = 2 échantillons douteux;
- 12 tubes dont la couleur des milieux restent bleus (inhibition) et dont la majorité donne un virage à des temps largement supérieurs que celui du témoin (sans échantillon)= 12 échantillons positifs ;

-Milieux ensemencés à partir de la dilution 10^{-2} (144 10^{9} UFC/ml): Nous avons :

- 14 tubes dont la couleur des milieux restent bleu ou bleu verts (inhibition) et ne donnant aucun virage à des temps supérieurs = 14 échantillons positifs;

Afin de trancher les conditions qui donnent les résultats les plus similaire à ceux trouvés par la méthode en boite unique : nous résumons dans le **Tableau 8,** l'ensemble des résultats trouvés pour les échantillons + et négatifs.

Tableau 8 : Résumé des résultats des tests d'inhibitions exercés sur les échantillons négatifs et positifs.

	100µl en surface				**200µl en surface**	
Dilutions	**10^{-1}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-1}**	**10^{-2}**
UFC/ml	**144 10^{10}**	**144 10^{9}**	**144 10^{8}**	**144 10^{7}**	**144 10^{10}**	**144 10^{9}**
12 Echantillons négatifs	6 échantillons négatifs 6 échantillons faux positifs	9 échantillons négatifs 3 échantillons faux positifs	6 échantillons négatifs 6 échantillons faux positifs		4échantillons négatifs 8échantillons faux positifs	8-9 échantillons négatifs 3-4 échantillons faux positifs
14 Echantillons positifs	12 échantillons positifs 2 échantillons douteux	14 échantillons positifs	14 échantillons positifs		12 échantillons positifs 2 échantillons douteux	14 échantillons positifs

En conclusion, la meilleure combinaison qui donne des résultats plus proches de ceux de la méthode en boite unique est la suivante :

- Une charge bactérienne de **144 10^{9} UFC/ml ;**
- Un volume de jus de viande de **100µl**, déposé **en surface**.
- Une durée d'incubation de **2H à 2H 30min,** suffisante pour tirer un résultat.

VI- Conclusion :

La production des viandes blanche en Algérie est importante ; cependant, elle est exposée à de nombreuses contraintes: mauvais états des locaux, infections à répétitions, installation des germes résistants. Ceci amène les éleveurs à utiliser des antibiotiques de façon abusive pour limiter les pertes au niveau des bandes d'élevage. Avec l'instabilité des prix sur le marché, l'éleveur se trouve obligé de vendre sa marchandise avant l'accomplissement du délai d'attente. De ce fait, le consommateur algérien se trouve face à des taux en résidus d'antibiotiques supérieurs à la limite maximale tolérée par la législation.

Le contrôle de notre ration protéique est devenu donc une nécessité. Afin de pouvoir contrôler systématiquement toutes les viandes mises sur le marché algérien, il faut que la méthode d'analyse soit efficace mais économique.

L'objectif principal de cette étude est la mise au point d'une méthode microbiologique de dépistage préselectif des résidus d'antibiotique, alternative aux méthodes de références, sensibles et adaptées à nos moyens économiques.

Dans un premier volet de notre étude, nous avons analysé nos échantillons par la méthode en boite unique. Un taux global d'échantillons positifs a été estimé de 40,54%.

Dans un deuxième volet de notre travail, une méthode microbiologique, dite méthode en tube a été mise au point. Nous avons démontré la faisabilité de ce test en utilisant deux milieux optimisés :

- Le Mueller et Hinton additionné de bleu de bromothymol à 0,01g/l. L'échantillon analysé dans ce milieu est un jus de viande neutralisé et décontaminé par une filtration stérilisante afin d'éliminer la flore de la viande;
- Le Mueller et Hinton additionné de NaCl à 50g/l et de bleu bromothymol à 0,01g/l. Le NaCl dans ce milieu joue un rôle sélectif inhibant le développement de la flore d'un échantillon.

Nous avons ensuite testé le pouvoir inhibiteur de 14 échantillons positifs et 12 échantillons négatifs (déjà analysés par la méthode en boite unique). La meilleure combinaison qui donne des résultats plus proches de ceux de la méthode en boite unique est la suivante :

- Une charge bactérienne en ***M. luteus*** de **144 10^9 UFC/ml ;**

- Un volume de jus de viande de **100µl**, déposé **en surface**.
- Une durée d'incubation de **2H à 2H 30min,** suffisante pour tirer un résultat.

Dans ces conditions, tous les échantillons positifs ont été détectés par cette méthode alternative, par contre 3 échantillons négatifs parmi 12 ont été estimés comme positifs donnant ainsi 3 faux positifs.

La méthode test est une méthode de présélection, faisable, très sensible et applicable, elle permet de détecter tous les échantillons positifs. La présence de faux positifs peut être éliminée par le passage aux méthodes de confirmation.

La méthode test est aussi économique, car elle est compétitive au Prémitest, méthode de présélection en tube importée et dont le coût est excessivement élevé. De plus, elle permet de donner un résultat dans un délai compétitif.

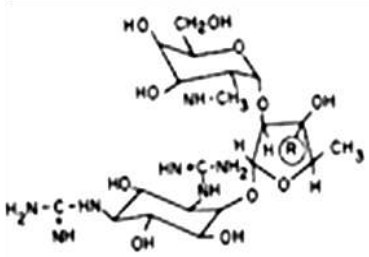
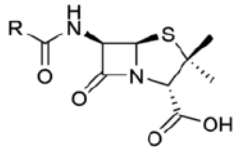
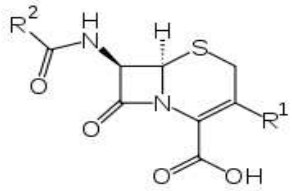
En fin pour pouvoir juger si cette méthode alternative proposée est applicable, beaucoup de travaux restent à explorer concernant:

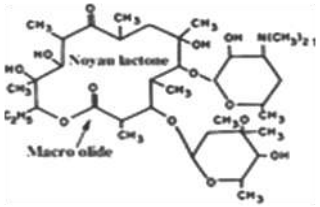
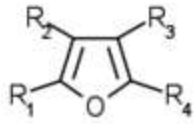
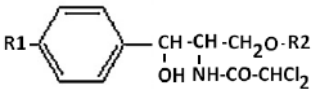
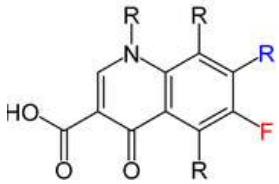
✓ La limite de détection, afin de trancher définitivement sur la possibilité de la présence de faux positifs,

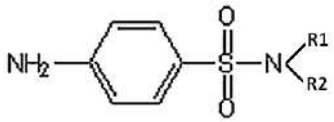
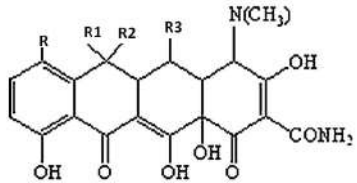
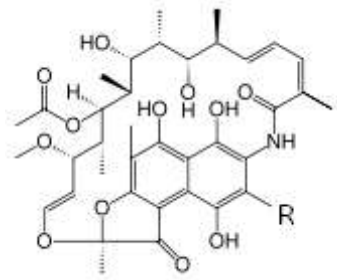
✓ La reproductibilité et la répétabilité,

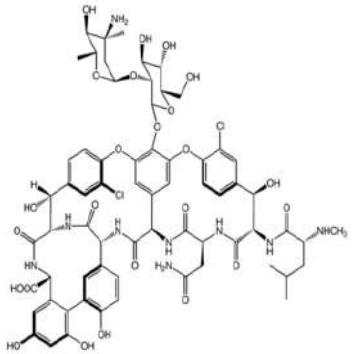
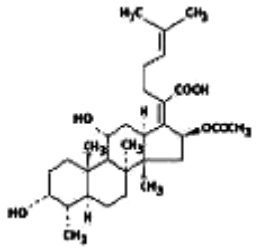
✓ Une comparaison avec :

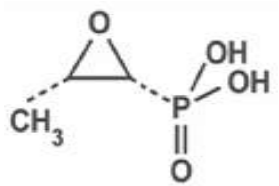
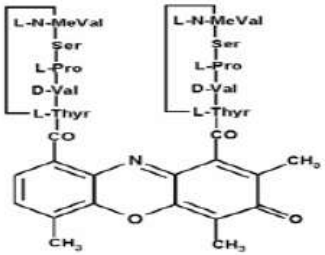
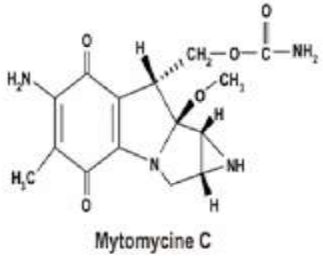
- les méthodes officielles qualitatives sur un échantillonnage plus grand,
- les méthodes quantitatives de référence (HPLC…).

Famille	Structure de base	Mode / Mécanisme d'action	Principaux groupes ou antibiotiques (Origine)	Spectre
Aminosides		Inhibition de la synthèse des protéines/ Fortement et rapidement bactéricides.	Streptomycine (*Streptomyces griseus*) Néomycine (*Streptomyces fradiae*) Kanamycine (*Streptomyces kanamyceticus*) Gentamycine (*genre Micromonospora*) Amykacine (*semi-synthèse*)	Etroit
Bêta- lactamines	Pénicillines :  Céphalosporines : 	Inhibition de la synthèse de la paroi/ Bactéricides.	Groupe de pénicilline G (*Pénicillium notatum)* Groupe de pénicilline M (Meticilline)(*Semi-synthèse)* Groupe de pénicilline A (Ampicilline)(*Semi-synthèse)* Céphalosporine C *(Cephalosporium acremonium)* Céphalosporine de 1ère génération (céfalotine), 2ème génération (céfamandole), 3ème génération (céfotaxime), 4ème génération …. (*Par semi-synthèse)*	Étroit
Polypeptides	Nature polypeptidique	Action sur la membrane externe des Gram-	Polymyxine (*Bacillus polymyxa*), Bacitracine (*Bacillus licheniformis*), Colistine, Tyrocidine.	Etroit

		/Bactéricides.		
Macrolides		Inhibition de la synthèse des protéines.	Erythromycine (*Streptomyces erythreus*), Spiramycine (*Streptomyces ambofaciens*).	Étroit
Nitrofuranes	A base de Noyau furane 	Inhibition de la synthèse de l'ADN.	Furaltadone, Furazolidone	Large
Phénicolés		Inhibition de la synthèse des protéines.	Chloramphénicol (*Streptomyces venezuelae*)	Large
Quinolones et fluoroquinolones		Inhibition de la synthèse de l'ADN/ bactérides rapides sur les Gram-.	Acide nalidixique, Acide oxolinique, Ciprofloxacine, Acide piromidique, ofloxacine, enrofloxacine.	Etroit.

Sulfamides		Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique. Bactériostatiques.	Sulfadiazine, Sulfadoxine, Sulfaméthoxydiazine, Sulfaméthoxazole (*Synthèse*).	Etroit
Tétracyclines		Inhibition de la synthèse des protéines.	Tétracycline (*Streptomyces texasi*), Chlortétracycline (*Streptomyces aureofaciens*), Oxytétracycline (*Streptomyces rimosus*). Doxycycline, Minocycline (*semi-synthèse*)	Large
Rifamycines		Blocage de la synthèse des ARN messagers.	Rifamycine SV (*Streptomyces mediteranee*), Rifaximine, Rifampicine	Large

Glycopeptides	Exempl : Vancomycine 	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane.	Teicoplanine, Vancomycine (*Streptomyces orientalis*)	Étroit
Acide fusidique		Inhibition de la synthèse des protéines.	Acide fusidique (*Fusdium coccineum*)	Étroit

Fosfomycine		Inhibition du pyroxyle transférase (synthèse de la paroi)	Fosfomycine	Large
Actinomycine		Inhibition de la réplication de l'ADN.	Actinomycine	Large
Mytomycine		Inhibition de la réplication de l'ADN.	Mytomycine	Large

Composition et préparation des milieux

1. Milieu Soja agar : Milieu non sélectif utilisé pour la culture les bactéries.

1.1. Composition :

- Peptone de caséine (ou Tryptone) :15g/l
- Peptone de soya : 5g/l
- Chlorure de sodium : 5g/l
- Gélose : 15g/l
- PH 7.3+/-0.2 à 25 °C

1.2. Préparation :

- Mettre 40g de soja en poudre dans litre déeau distillée chauffée.
- Distribuer en flacon de 500mi.
- Stériliser dans l'autoclave 120°C pendant 15-20min.
- Couler les boites de pétri.

2. Mueller et Hinton :

2.1. Composition :

- Extrait de bœuf (viande) :300ml
- Peptone de caséine : 17.5g
- Amidon de mais :1.5g
- Agar :17g
- PH=7.4

Ces ingrédients sont mélangés, le mélange est déshydraté.

2.2. Préparation :

- Mettre 38g de Muller et Hinton en poudre dans 1 litre d'eau distillée chauffée.
- Bouillir le milieu jusqu'à dissolution.
- Mettre cette gélose dans un flacon de stérilisation.
- Mettre les flacons dans l'autoclave à 116°C pendant 15-20 min.
- Laisser les flacons refroidir.

3. Gélose nutritive :

3.1. Composition :

- Extrai de viande :1g/l
- Etrai de levure : 2.5g/l
- Peptone :5g/l
- Chlorure de sodium :5g/l
- Agar :15g/l
- PH=7

3.2. Préparation :

- Mettre 28g (à28.5g) par litre d'eau distillée.
- Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15-20 minutes.

Volume de NaOH nécessaire pour neutraliser un jus de viande ….

1-Préparer des tubes (ou bouchons) dont la largeur permet l'entré de l'électrode du pH mètre. En utilisant l'eau distillée, préciser le minimum de volume qui permet une bonne mesure du pH.

2-Prendre un bréchet entier, le congeler pendant 24H, le décongeler dans une boite (le faire sortir du congélateur la veille de son utilisation et le laisser décongeler à 4°C afin de libérer le maximum de son jus). Presser le pour récupérer le reste du jus et mélanger tout les jus récupérés.

3-Préparer une solution de NaOH 1N, 2N, ….

4-Répartir le jus en tubes selon le volume précisé en 1.

5- En utilisant le NaOH 1N neutraliser le jus de viande avec des ajouts de 50µl (ou 20µl). Apres addition de chaque 50µl, mélanger et mesurer le pH, si la neutralité n'est pas atteinte, ajouter encore 50µl jusqu'à neutralisation de la viande. Calculer le volume total de NaOH ajouté, s'il dépasse 10% du volume du jus, augmenter la concentration du NaOH à 2N, ….. si cette dernière donne un résultat > 10%, passer à 3N…. ainsi de suite jusqu'à obtention d'un total d'ajout de NaOH inférieur ou égale à 10%. (10% càd 100µl pour 1ml de jus, ou 200µl pour 2ml ……).

Résultats des analyses des échantillons par la méthode boite unique.

Echantillon	Nature de la matrice	Méthode en boite unique	Diamètre de la Zone d'inhibition
E1 dda	M. poulet	+	2mm
E2 dda	M. poulet	+	2.2mm
E3 dda	M. poulet	+	2mm
E4 dda	M. poulet	+	1.2mm
E5 dda	M. poulet	+	2.5mm
E6 dda	M. poulet	+	1.5mm
E7 dda	M. poulet	+	1.6mm
E8 dda	M. poulet	+	2.1mm
E12 dda	M. poulet	+	2.2mm
E13 dda	M. poulet	+	1mm
E14 dda	M. poulet	+	1.5mm
E17 dda	M. poulet	+	1.1mm
M1	M. poulet	+	2.4mm
M3	M. poulet	+	2.7mm
M4	M. poulet	+	1.7mm

Référence :

[1] Albert. L, Précis de pharmacie chimique usuelle à l'usage des pharmaciens et étudiants en pharmacie. Paris : Techniques et documentation, Paris, 1977.

[2] Yalad. D, Merad .A.S, Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 2001(91).

[3] Kermezli. Y et Tir. M, Etude de la possibilité d'obtention de l'Acide 6 Amino Penicillanique à partir de la pénicilline V Potassique, *Mémoire d'ingénieur d'état en chimie industrielle,* Centre Universitaire de Médéa, 1993.

[4] Webb. C .J et Edwards. D, Les antibiotiques à attaque, Encyclopédie des techniques de pointe ,1979.

[5] Vladimir. B, The Chemistry and Biology of Antibiotics, Pharmacochemistry library, No 5) Hardcover – April 1, 1983

[6] Muller L.M, Méthode de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. *Thèse de doctorat*, Université Claude Bernard-Lyon, 1995.

[7] internet :www.antibiotiques-info.org.

[8] Euzeby,J.P, dictionnaire de bactériologie vétérinaire.2005.

[9] Catherine Gaudy, Jacques Buxeraud, antibiotiques (pharmacologie et thérapeutique page 5 à 21.

[10] Michel SCHORDERET et collaborateur,1989. Edition Slatkine,Genéve :pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.

[11] Schwarz S., Kehrenberg C, Use of antimicrobial agents in veterinarymedicine and food animal production *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001, 17, (6), p431-437

[12] Zanditenas M, L'usage des antibiotiques par les vétérinaires praticiens : enjeu sanitaire et socioéconomique,conséquences pour la santé publique et évolution prévisible de la profession vétérinaire.*Thèse de Doctorat vétérinaire*, Créteil, 1999, n°88, 124p

[13] STOLTZ Rémi, LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES DENREES D'ORIGINE ANIMALE : EVALUATION ET MAITRISE DE CE DANGER, THESE de doctorat, l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I, 17 décembre 2008, Lyon.

[14] Maillard R, Antibiothérapie respiratoire *La Dépêche Vétérinaire*, 2002, 80, p15-17

[15] AFSSA, Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé Humaine *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, 2006, 214p

[16] Mogent. L et AL, Bactéries pathologiques, Antibiotiques et Antibiothérapie en aviculture, CEVA University. (2005).

[17]Béatrice Châtaigner, Antoine, Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar, Thèse de doctorat, *Ministère de l'élevage- Institut Pasteur*, France.

[18] Jaussaud P, Cours de pharmacologie de première année de deuxième cycle, *Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon*, 2002.

[19] Site Internet : www.delvotest.com;

[20] PUYT, M, Antibiothérapie en aviculture, bulletin des GTV, (1995)

[21] ICH. E6, Good Clinical Practice: Consolidated Guidance. International Conférence on Harmonisation, Geneva (Jérôme HENRI, THESE ; Etude comparative de deux ionophores carboxyliques chez la volaille : Apport de la modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie.1996. ;

[22] Fiscus-Mougel F, Les résidus d'antibiotiques à usage vétérinaire dans le lait et la viande *Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Claude Bernard*, Lyon, 1993, n°53, 84p

[23] Reig. M, Toldra. F, Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection, *Meat Science*, 2008, 78 (1-2) 60-67.

[24] Wal. J.M, Evolution of the concept of residues in the Products of animals raised with the use of antibiotics , *Ann. Nutr. Aliment.*, 1979, 33 (3) 325-341.

[25] Dewdney. J.M, Maes. L, Raynaud. J.P, Blanc. F, Scheid. J.P, Jackson. T., Lens. S, Verschueren. C, 1991.

[26] Dayan A.D. Allergy to antimicrobialResidues in Food : assessment of the risk to man *Veterinary Microbiology*, 1993, 35, (3-4), p213-226

[27] Perrin-Guyomard. A, Poul. J.M, Corpet. D.E, Sanders P, Fernandez. A.H, Bartholomew. M, Impact of residual and therapeutic doses of ciprofloxacin in the human-flora-associated mice model, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005, 42 (2) 151-160.

[28] Carbonnelle. B, Marmonier. F, Vargues. R, Bactériologie médicale : techniques usuelles, Ed. SIMEP, paris, 1987, pp 274.

[29] HART. T, SHEARS. P, Atlas de poche de microbiologie , I'" édition, Paris, 1997.

[30] Fabre.J.M et Devos. N, détection générale de l'alimentation, www.merial.com

[31] Gaudin. V, Fabre. J.M, Rault. A, Rapport_Etude_préliminaire, *AFSSA*, doc.090206, France.

[32] Merial France , des méthodes de recherche d'antibiotiques dans la viande se développent en France, Semaine des vétérinaires: www.merial.com.

[33] Bada Alambedji . R, Contrôle des résidus, Dakar, 2008.

[34] Beslin. J, Attestation de validation de méthode alternative d'analyse, France, (2008-2010).

[35] La stabilité est donnée à partir de la date de fabrication Version AR03/août -02.

[36] Caude. M et Jardy. A, Méthodes chromatographiques : introduction, *Technique d'ingénieur*, PE 1445- (1-6).

[37] Caude. M et Jardy. A, Chromatographie en phase liquide : appareillage et applications, *Technique d'ingénieur*, PE1 456- (1-17).

[38] Caude. M et Jardy. A, Chromatographie en phase liquide : Théorie et méthodes de séparation, *Technique d'ingénieur*, PE1 455- (1-47).

[39] Abiola. F.A, Diop. M.M, Teko-Agbo. A, Delepine. B, Biaou. F.C, Roudaut. B, Gaudin. V et Sanders. P, Résidus d'antibactériens dans le foie et le gésier de poulets de chair dans les régions de Dakar et de Thiès (Sénégal), *Revue Méd. Vét.*, 2005, 156 (5) 264-268.

[40] Lee J.B, Development of an analytical protocol for detecting antibiotic résiduels in various foods, *Food Chemistry*, 2007, 105, 1726–1731.

[41] Kunihiro Kishida, Quantitation and confrmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography–mass spectrometry with photodiode array detection, Food Control, 2007, 18, 301–305.

[42] Krebber. R, Hoffend. F.J, Ruttmann. F, Development - Residues, Operator and Consumer Safety, *Germany Bayer Crop Science AG , Alfred-Nobel-Str*. 50, 40789, 2008.

[43] Siouffi. A.M, Postaire. E, Pradeau. D, Chromatographie planaire, *Technique d'ingénieur* PE1 475- (1-25), 2002.

[44] MAZOUZ IMENE, Mémoire de fin d'étude, mise au point de méthodes alternatives pour le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des viandes, 2011-2012.

[45] Ben Mohand.C, Contribition à l'étude des résidus d'antimicrobiens dans le muscle de poulet de chair ;2008.

[46] Mansouri. N, la recherche de résidus de substances animicrobiennes dans les Wilayas d'Anaba,Constantine, El-Taref et Skikda. These de magister, université d'El-Taref,Algérie,2007.

[47] Kenniche et Riat, Contribition à la recherche de résidus d'antibiotiques dans la volaille type <‹poulet de chair ›› dans la Wilaya Tizi-ouzou, Mémoire de fin d'étude, Université Mouloud Mammeri,2003.

[48] Boussila. F, Mémoire de fin d'études en vu de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en génie des procédés pharmaceutiques.Université Yahia Fares de Médéa, institut des sciences de l'ingénieur ; Médéa ,2010.

[49] Chataigner et Stevens, Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées a Dakar.Institut Pasteur de Dakar,2005,51,3-7.