République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université "Dr. Yahia Fares" de Médéa



Faculté des sciences et technologie
Département de génie des procédés et environnements

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en génie des procèdes
Option : génie des procèdes pharmaceutiques

Thème :

Mise au point de méthodes alternatives pour le depistage des résidus d'antibiotiques au niveau des viandes

Présenté par :

MAZOUZ IMENE

Proposé et dirigé par :

M^{me} .Tassist Amina(Promotrice)

Promotion 2011-2012

ملخص

الهدف من هذه الدراسة الكشف عن وجود المضادات الحيوية في اللحوم البيضاء (الكبد و العضلة) و اللحوم الحمراء (لحم البقر و لحم الغنم) وذلك اعتمدا علي طرق ميكروبيولوجية معتمدة وخاصة طرق ميكروبيولوجية بديلة جديدة و التي تتطابق و تتماشى مع قدراتنا المالية و الاقتصادية .تطبيق هذه الطرق على العينات المختبرة (95 عينة) أعطتنا النتائج أو النسب المئوية التالية : 22.10% من مجموع الكلي للعينات تحتوى علي بقايا المضادات الحيوية (15 من عينات الكبد, 32.2 % من عينات اللحوم البيضاء (العضلة), 26.6 % من عينات لحم البقر تحتوى علي بقايا المضادات الحيوية). إن الطرق البديلة قد أعطت نتائج جيدة بوسائل و إمكانيات مقتصدة على الطرق الميكروبيولوجية المعتمدة مما يستدعي علينا المصادقة عليها من اجل أن تصبح طرق معتمدة و يمكننا العمل بها.

الكلمات المفتاحيه: بقايا المضادات الحيوية, اللحوم البيضاء, اللحوم الحمراء ,الكبد ,طريقة العلبة الواحدة,طريقة الانبوب.

Résumé :

Notre travail s'intéresse à la recherche des résidus d'antibiotiques dans (foie, muscle de poulet, bovin et ovin) en utilisant des méthodes microbiologiques officielles et surtout des méthodes microbiologiques(en une seule boite, en tube) alternatives adaptées à nos moyens économiques. L'application de ces méthodes sur un nombre d'échantillon test (95 échantillon) nous a donné les pourcentages suivants : 22.10% des échantillons sont contaminés par des résidus d'antibiotiques, 15% d'échantillon de foie, 32.2% des échantillons de muscle de poulet et 26.6% des échantillons de bovin sont positifs. Nous avons obtenus des résultats prometteurs avec les méthodes alternatives qui sont plus économiques que les méthodes officielles ; ce qui nécessite une validation de ces méthodes pour pouvoir les utiliser.

Mots clefs: Résidus d'antibiotiques, Viandes blanches, Viande rouge, Foie, méthode en une seule boite, méthode en tube.

Abstract:

Our work focuses on the detection of residues of antibiotics in the liver, chicken muscle, cattle and sheep using methods microbiological and especially official alternative microbiological methods adapted to our economic means. The application of these methods on a number of test sample (95sample) gave us the following percentages: 22.10% of samples were contaminated with antibiotic residues, 15% of liver sample, 32.2% of samples chicken muscle samples and 26.6% of cattle were positive. We have obtained promising results with alternative methods that are more economical than the official methods, which require validation of these methods to use them.

Keywords: Antibiotic Residues, white meat, red meat, liver, one box method, tube method.

Remerciements

Je remercie premièrement ALLAH le tout puissant pour nous avoir donné la santé, la Volonté et le courage, sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

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.

J'exprime mes remerciements à ma promotrice, Mme. Tassist Amina pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail, pour les très précieux conseils et les encouragements qu'elle n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

Je suis très reconnaissante envers toute l'équipe du service de stérilité du groupe SAIDAL de MEDEA, le personnel du laboratoire d'analyse microbiologiques (DSP de Médéa) et du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de ksar el boukharie pour leur aide sans limites et pour leur soutien morale pendant ce travail.

Je remercie également : Mr Slama, inspecteur principal des vétérinaires (DDA), M^{me} Slama et M^{me} Talamali, vétérinaire responsables du contrôle au niveau des point d'abattage pour nous avoir facilité les prélèvements au niveau des abattoirs.

Mes remerciements vont à toute personne qui a aidé de près ou de loin à réaliser ce mémoire.

MAZOUZ. I

Sommaire

Introduction générale

Chapitre I : partie bibliographie

1. HISTORIQUE…….1

2. DEFINITION D'UN ANTIBIOTIQUE……..……2

3. EFFET BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE DES ANTIBIOTIQUES……...2

4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES……2

4.1. Critères de classification……..…2

4.2. Classification des antibiotiques selon leur origine……...3

4.2.1. Fermentation ou extraction……...…3

4.2.2. Semi-synthèse……..….3

4.2.3. Synthèse chimique totale……..…4

4.3. Classification des antibiotiques selon la structure chimique……..4

4.4. Classification des antibiotiques selon le mode d'action (selon la cible bactérienne)…….4

4.4.1. Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne……..... 5

4.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane cellulaire……...5

4.4.3. Antibiotiques agissant sur les ribosomes……..5

4.4.4. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse des acides nucléiques……..6

4.4.5. Antibiotiques agissant par autres mécanismes……..6

4.5. Classification des antibiotiques selon la structure le spectre d'action…….7

4.6. Classification des antibiotiques par famille…….....7

5. USAGES DES ANTIBIOTIQUES DANS L'ELVAGE D'ANIMAUX ……....12

5.1. Objectifs……12

5.2. Les molécules utilisées en élevages d'animaux……13

5.3. Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs……15

5.3.1. Définition d'additifs…….....15

5.3.2. Effets des additifs……15

5.4. Utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance……17

5.5. Association des antibiotiques……18

5.6. Pharmacocinétique des antibiotiques……19

5.6.1. L'absorption…….....19

5.6.2. La distribution……19

5.6.3. Les transformations……20

5.6.4. Excrétion…….20
6. LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ALIMENTS : RISQUE POUR LE CONSOMMATEUR …….....21
6.1. Définition du résidu…….....21
6.2. Facteurs de persistance des résidus…….....21
6.3. Cause de la présence résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires ……....22
6.4. Risques engendrés par les résidus d'antibiotiques…….....22
6.5. Risques pour la santé publique…….....22
6.5.1. Toxicité direct…….....22
6.5.2. Réactions allergiques…….....23
6.5.3. Acquisition des résistances aux antibiotiques…….....23
6.5.4. Modification de la flore intestinale ……....24
6.6. Risques pour la santé animale……....24
6.7. Risques d'ordre technologique…….....25
6.8. Risques pour l'environnement ……....25
7. DELAI D'ATTENTE…….....26
7.1. Définition…….....26
7.2. Fixation du délai d'attente…….....26
8. LIMITES MAXIMALES DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES (LMR) …….....27
8.1. Définition…….....27
8.2. Fixation de la limite maximale d'un résidu (LMR)…….....27
9. METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES…….....34
9.1 Les critères de choix d'une méthode…….....34
9.2. Choix de la méthode et objectifs…….....35
9.3. Méthodes Biologiques (Microbiologiques) de dépistage des résidus d'antibiotiques….36
9.3.1. Méthode alternative (Prémi®test)…….....37
9.3.2. Méthode de référence (méthode des quatre boites)…….....39
9.3.3. Méthode STAR (Screening Test for Antibiotic Residues)……..40
9.3.4 Test rénal belge…….....41
9.4. Méthodes physico-chimiques…….....42
9.4.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)…….....42
9.4.2. Chromatographie sur couche mince CCM…….....44
Chapitre II : matériels et méthodes
1. Lieu de travail……...45

2. Matériels…….....45
2.1. Matériel biologique…….....45
2.1.1. Echantillons…….....45
2.1.2. Souches bactériennes…….....45
2.2. Produits et milieux…….....46
2.3. Verrerie et petit matériel……....46
2.4. Grand matériel…….....47
3. Méthodes…….....47
3.1. Sondage sur terrain…….....47
3.2. Analyses microbiologiques au laboratoire par les méthodes officielles…….....47
3.2.1. Présélection par Prémi®Test…….....48
3.2.2. Confirmation par la méthode de référence associée à la méthode STAR…….....48
a- Réactivation des souches…….....49
b- Dénombrement…….....49
c- Détermination de la suspension qui servira d'inoculum…….....52
d- Contrôle de la sensibilité des souches …….....52
e- Protocole opératoire proprement dit …….....53
3.3. Mise au point de méthodes alternatives …….....54
3.3.1. Réactivation des souches …….....54
3.3.2. Dénombrement …….....56
3.3.3. Test de la sensibilité des souches choisie …….....56
3.3.4. Méthode en une seule boite …….....56
a-Choix du milieu …….....56
b-Choix de la souche……...57
3.3.5. Méthode en tube……..57
a- *principe*……57
b- méthode en tubes sur milieu Muller et Hinton……57
c-méthode en tube sur mannitol mobilité ……61

Chapitre III : Résultats et discutions

1. Sondage sur terrain……...64
2. Analyses microbiologiques au laboratoire par les méthodes officielle …….....66
2.1. Présélection par Prémi®Test…… ……66
2.2. Confirmation par la méthode de référence associée à la méthode STAR…… ……68
2.2.1. Contrôle de la sensibilité des souches ……68
2.2.2. Résultats obtenus ……70

a- Expression du résultat global ……72
b- Résultats par rapport à chaque famille d'antibiotique ……74
c-Résultats par rapport aux nombre de résidus d'antibiotiques dans chaque échantillon ...…76
2.3. Mise au point de méthodes alternatives ……78
2.3.1. Test de la sensibilité des souches choisie ……78
2.3.2. Méthode en une seule boite…….80
a-Choix du milieu ……80
b-Choix de la souche ……83
c- comparaison prémitest/méthode en une seule boite …….85
2.3.3. Méthode en tubes ……87
a-sur Muller et Hinton……..87
b-sur milieu mannitol mobilité……..91
a- Optimisation de l'inoculum bactérien …… ……92
b- Test en présence d'échantillon contenant des antibiotiques …… ……93
c- Optimisation de la hauteur du milieu …… ……93
Conclusion générale
Bibliographie
Annexes

Liste des tableaux

N° tableau	Titre de tableau	Page
1	Date de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles	**1**
2	Classification des antibiotiques par famille	**8**
3	Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine	**13**
4	Les molécules d'antibiotiques utilisées en médicine humaine et vétérinaire	**14**
5	Les principaux antibiotiques utilisés en aviculture	**15**
6	Les principaux additifs antibiotiques utilisés jusqu'à 2005	**16**
7	Délais d'attente fixés pour quelques antibiotiques utilisés en élevage	**27**
8	Limites maximales résiduelles des antibiotiques exprimées en µg/kg ou ppb	**29**
9	Correspondance souches et milieux avec les familles dépistées	**40**
10	Tableau de référence pour la lecture de l'antibiogramme	**53**
11	Correspondance souches et milieux avec les familles dépistées	**53**
12	Zone de virage de quelques indicateurs colorés	**59**
13	Résultats globaux obtenus pour le Prémi®Test.	**67**
14	Diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour chaque souche	**68**
15	Résultat final de l'antibiogramme	**70**
16	Diamètres moyens obtenus pour les solutions témoins	**71**
17	Résultats globaux obtenus pour la méthode des quatre boites associée à la Méthode STAR.	**72**
18	Nature des résidus d'antibiotiques présents dans les échantillons de foie	**74**
19	Familles dépistées au niveau des échantillons de muscle de poulet	**74**
20	Répartition des échantillons de bovin positifs par rapport aux familles d'antibiotiques dépistées	**75**
21	Pourcentage des échantillons de muscle de poulet positifs par rapport au nombre de résidus d'antibiotiques	**76**
22	Pourcentage des échantillons de muscle de bovin positifs par rapport au nombre de résidus d'antibiotiques	**77**
23	Résultats de l'antibiogramme de *B. stearothermophilus* et *S. aureus*	**79**
24	Zones annulaires d'inhibitions obtenues pour la méthode en boite sur Mueller/Hinton et Soja agar	**81**
25	Zones annulaires d'inhibitions obtenues sur Mueller/Hinton pour *M. luteus*	**83**

Liste des figures

N° de figure	Titre de la figure	page
1	Structure chimique de certaines molécules antibactériennes	**4**
2	Principaux sites d'action des antibiotiques	**6**
3	Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques	**18**
4	Technique du premi®Test	**38**
5	Test rénal	**41**
6	Schéma du principe d'un chromatographe en phase liquide	**43**
7	Dispositif de la chromatographie sur couche mince	**44**
8	Protocole de réactivation des souches	**50**
9	Procédé générale du dénombrement	**51**
10	Technique de la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR	**55**
11	Choix de l'indicateur et l'inoculum bactérien : Protocol expérimentale	**60**
12	Optimisation de l'inoculum bactérien : Protocol expérimentale.	**63**
13	Exemple d'un schéma de gestion de l'antibiothérapie chez un élevage de poulet	**64**
14	Exemple de lecture d'un Prémi®Test après incubation	**66**
15	Résultat de Prémi®test pour les différents échantillons prélevés	**67**
16	Zones d'inhibitions obtenues pour les différentes souches	**69**
17	Résultats des témoins après incubation	**71**
18	Résultats des échantillons analysés après incubation	**72**
19	Résultat globale de la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR pour les échantillons : foie, muscle de poulet, bovin, ovin	**73**
20	Représentation graphique des échantillons de muscle de poulet positifs par rapport aux familles d'antibiotiques	**75**
21	Représentation graphique des échantillons de bovin positifs par rapport aux familles d'antibiotiques	**76**
22	Représentation graphique de la répartition des échantillons de muscle de poulet positifs sur la base du nombre de résidus présents.	**77**
23	Pourcentage des échantillons de muscle de bovin positifs par rapport au nombre de résidus d'antibiotiques.	**78**
24	Zones d'inhibitions obtenues pour *B. stearothermophilus* et *S. aureus*	**79**
25	Zones d'inhibitions obtenues pour quelques échantillons positifs sur les différents milieux testés	**82**

N° de figure	Titre de la figure	page
26	Zones d'inhibitions obtenues sur Mueller/Hinton pour *M. luteus*	**84**
29	Virage de couleur du milieu additionné de rouge de phénol	**88**
30	Couleur du milieu additionné de pourpre de bromocrésol après incubation	**88**
31	Résultat après ensemencement du jus de viande	**90**
32	Résultat après incubation en présence de jus de viande	**90**
33	Résultat après la filtration du jus de viande.	**91**
34	Couleur du milieu Mannitol après incubation de *M. luteus*.	**92**
35	Optimisation de l'inoculum bactérien : Résultats obtenus après incubation des tubes (mannitol-mobilité) ensemencés à partir des différentes dilutions	**92**
36	Optimisation de la hauteur du milieu: Résultats obtenus après incubation des tubes contenant 0,25ml de milieu (mannitol-mobilité) ensemencés à partir des différentes dilutions	**94**

Abréviation

µg	microgramme
µl	micro litre
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGP	antibiotic growth promotors
ARF	antibiotiques régulateurs de la flore
ARN m	acide ribosome nucléique messagerie
ATB	antibiotique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CEE	Communauté Economique Européenne
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CSP	Code de la Santé Publique
DHPS	dihydroptéroate synthétase
DJA	Dose Journalière Admissible
DES	la Dose Sans Effet
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
GMQ	gain moyen quotidien de poids vif
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IC	indice de consommation
IEV	Institut d'Expertise vétérinaire
Kg	kilogramme
LMR	Limite Maximale des Résidus
mm	millim
Ppb	parties par milliard
Ppm	parties par million
SFM	société française de microbiologie
SM	spectrométrie de masse
TR	temps de rétention
UFC	unité formant colonies

REFFERENCE BIBIOGRAPHIE

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

2. **Bada Alambedji. R**, Contrôle des résidus : Exemple des antibiotiques dans les aliments au Sénégal, Conférence de l'OIE sur les médicaments vétérinaires en Afrique. « Harmonisation et amélioration de l'enregistrement, de la distribution et du contrôle de qualité », Dakar (Sénégal), 25-27 mars 2008. web.oie.int/.../**ALAMBEDJI**_2603_Session2_Legislation%20&%20**Control**%20Africa_Manuscript_fr.pdf.

3. **Ben Mohand. C**, Contribution à l'étude des résidus d'antimicrobiens dans le muscle de poulet de chair, 2008.

4. **Berthe. T, Moisan. A et Carrie. J**, Résidus d'antibiotiques dans les aliments. 1ères rencontres des Laboratoires Publics de l'Ouest, 2007. http://www.cg56.fr/pdf/LPO_residus_antibiotiques.pdf.

5. **Bezoen . A, Van Haren . W, Hanekamp. J-C**, Human Health and Antibiotic Growth Promotors (AGPs): Reassessing the Risk. Heidelberg Appeal Nederland studies, 1999. http://www.stichting-han.nl/english/studies.html

6. **Bousilla. 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, 2009.

7. **Bourin. M, Lievre. M, Allain. H,** Cours de pharmacologie, 3éme édition, chapitre médicaments ani-infectieux, page 291-307, 1993. Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option : hygiène alimentaire, Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

8. **Broes . A, Boutin . R, Delorme. M,** Utilisation des médicaments. Guide porc, comité production porcine, page 4-6, 1999. http://www.cdpqinc.qc.ca/Champs_dactivite/04Sante/references/Medicamen%20CPAQ%20final.pdf

9. **Caude. M et Jardy. A, I**, Chromatographie en phase liquide : Théorie et méthodes de séparation, *Technique de l'ingénieur*, PE1, 455- (1-47).

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

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

12. Châtaigner et Stevens, Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées a Dakar. *Institut Pasteur de Dakar*, 2005, 51, 3–7. http://www.redev.info/Doc/Polagri/III-Pol-Agri-securite-alimentaire/III-Devlocal/nquete_residus_AB_Senegal.pdf

13. Chatellet. M.C, Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou. Thèse de docteur vétérinaire, École nationale vétérinaire d'ALFORT, 2007. Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option : hygiène alimentaire, Spécialité: surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008- 2009.

14. Corpet. D.E, Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques, Méd. Vét., 2000, 151 (99-104). Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option : hygiène alimentaire, Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

15. Colatrella. M.O, Maladies des bovins, 3ème édition. Chapitre VIII, p.46, 2000. Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option: hygiène alimentaire, Spécialité: surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

16. Cuq. J.L, Microbiologie alimentaire. Chapitre : les agents antimicrobiens, p. 125-130, 2008. http://diffusiondessavoirs.uomlr.fr/balado/wp-content/uploads/2007/10/poly-coursbio-stia2-007.pdf

17. Devie. P, Divol. A, Gilbert. G, Laurent. S, Le Goaziou. A, Olivon M, Petit. J, Les antibiotiques dans l'alimentation animale, p. 1-30, 2006.
http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Prod-Anim/antibio.pdf

18. DENIER. T, Etude des résidus d'antibactériens dans les poissons. Thèse. Méd. Vét. : Alfort, 1991. Cité dans « K. P.SOUMAHORO, recherche des résidus chloramphénicol dans les viandes des ruminants en cote d'ivoire : mise en place d'une méthode analytique », Thèse de diplôme d'état, école inter–états des sciences et médecine vétérinaire, université de CHEIKH ANTA DIOP DAKAR, 1992.

19. Duval. J et Soussy. C.J, Antibiothérapie (4éme édition), p. 3-58, 1990.

20. Eloit. M, Plan de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les viandes d'animaux de boucherie, de volailles, de gibiers, de lapins et de poissons d'élevage, 2004. IMG/PDF/dgaln20068240z-3.pdf.

21. Errecalde. J.O, Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pùblica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2004
ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf

22. Fabre. J.M, Bouquet. O et Petit. C, Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, p. 25-47**, 2006**. www.delvotest.com

23. FEINBERg. M, La validation des méthodes d'analyse : une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire. Edition Masson, p.397, Paris, 1996.

24. Fontaine. J, Vade-mecum du vétérinaire, formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène, 15ème édition, Volume 1, p. 106-119, 1992.

25. Fraysse. J.L et Darré. A, 1990, Produire des viandes sur quelles bases économiques et biochimiques, volume 1, p. 5-49, 264-269.

26. Gaudin. V, Fabre. J.M, Rault. A, Rapport d'Etude préliminaire, *AFSSA*, doc.090206, France. www.afnor-validation.org/**rapport**s.../Synt%20DSM%2028-1%2006-06.pdf

27. Gaudin. V, Test rapide de détection de résidus actifs d'antibiotiques de la famille des beta-Lactames (pénicillines, céphalosporines) dans le lait, Dossier de reconduction de la validation du test Béta-S.t.a.r, AFSSA, 2005. http://www.afnorvalidation.org/rapports-synthese/CHR%20HANSEN/Synt%20CHR%2020-3%2003-01%20(2005).pdf

28. Gogny. M et Puyt. J.D, Classification des principes actifs, Editions le point vétérinaire, p. 2-6, 2001. Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option : hygiène alimentaire, Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

29. Guillemot. D, Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, p. 10-214, 2006, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option : hygiène alimentaire, Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

30. Guérin-Faublée, Principes de l'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire, 2006, http://www.medspe.com/site/articles/20020320/article3/guerin.pdf

31. H.LECLERC, D.IZARD, M.O HUSSON, P.INATTRE, E.JAKUBEZAK, Microbiologie générale, 2éme édition, Paris, 1983.

32. Jacquemin. F, Viandes : Après les hormones, les antibiotiques, 2006, http://pagesperso-orange.fr/alps08-carignan/viandes.htm#haut

33. Kenniche et Riat, Contribution 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.

34. Kirkpatrick. D, L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation: les conséquences pour la résistance et la santé humaine, p. 17-229, 2002. http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/amrram_final_report-rapport_06-27_f.pdf

35. Klotins. K, Utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance: controverse et solutions**,** 2006.
http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/animalcare/amr/facts/05042.htm

36. Koenen-Dierick K., Okerman L., De Zutter L., Degroodt J.M., Van Hoof J. and Srebrnik S. A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method. *Food Additives and Contaminants*, 1995, (12)77-82.

37. Kölbener. P et al, Résidus de médicaments vétérinaires, page 1-2. Manuel suisse des denrées alimentaires. Chapitre 55, 2005.
www.baganw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Data%20SLMB_MSDA/Version%20F/55_Residus%20de%20medi.%20veter..pdf

38. Kunihiro Kishida, Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography–mass spectrometry with photodiode array detection, *Food Control*, 2007, (18) 301–305.

39. Krebber. R, Hoffend. F.J, Ruttmann. F, Développent - Residues, Operator and Consumer Safety, *Germany Bayer Crop Science AG, Alfred-Nobel-Str*. 50, 40789.

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

41. Mansouri. N, La recherche de résidus de substances antimicrobiennes dans les Wilayas d'Anaba, Constantine, El-Taref et Skikda. Thèse de magister, université d'El-taref, Algérie, 2007

42. Maur. N, Vade-mecum des antibiotiques, 5ème édition, p. 13-73, 1990. Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option : hygiène alimentaire, Spécialité: surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

43. Maur. N, Vade-mecum des antibiotiques et agents chimio-thérapeutiques anti-infectieux, 4ème édition, p. 7-397, 1979. Cité dans « ZEGHILET NOUREDDINE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) », Thèse de Magister en médecine vétérinaire, Option: hygiène alimentaire, Spécialité : surveillance de la chaîne

alimentaire de la filière viande, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTE DES SCIENCES, 2008-2009.

44. Mevius . D-J, Rutter . J-M, Hart . C-A, Imberechts . H, Kempf . G, Lafont . J-P, Luthman . J, Moreno . M-A, Pantosti . A, Pohl . P, Willadsen . C-M, Antibiotic résistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary médicine. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary médicinal Product, p. 1-57, 1999. Editions Le point vétérinaire, 2001.

45. Milhaud. G, L'utilisation rationnelle des médicaments vétérinaires et le temps d'attente. *Rec. Méd.Vét.*, 1978, 154 (2) 177-185.

46. Milhaud. G et Pinault. L, Législation de la pharmacie vétérinaire. Editions le point vétérinaire. Chapitre III : évaluation des médicaments vétérinaires : Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), limites maximales de résidus (LMR), p. 25-40, 1999. Edition le point Vétérinaire, 2001.

47. Mogenet et Fedida, Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles. Thèse de magistère département des sciences vétérinaires d'El Khroub, Université de Mentouri Constantine (UMC), Algérie, 1998.

48. Oxoby, Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones. Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques, 2002.

49. Pinault. L, Limites maximales de résidus (LMR), p. 1-8, 1998. Editions Le Point Vétérinaire, 2001.

50. Pouliquen. H et Le Bris. H, Residues of antibacterial drugs in foodstuff of fish origin: risk assessment, Méd. Vét., 2002, 153 (10) 675-678.

51. Pujol-Dupuy, Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers. Thèse du docteur vétérinaire de l'école nationale vétérinaire de Lyon**,** 2004.

52. Puyt. J.D et Guérin-Faublée. V, Médicaments anti-infectieux en médicine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie. p. 1-27, 2006.

53. Rod D-C, Bu. L, Bédéchian. F, La politique de santé de l'union européenne. Lettre d'information n° 2 décembre, 2001. http://www.europe-ecologie.com/IMG/pdf/doc-34.pdf

54. Sachot. E et Puyt. J.D, Résidus médicamenteux. Les différents calculs du temps d'attente, Edition Le Point Vétérinaire N°212 2 2, p. 2-5, Janvier-Février, 2001.

55. Scippo. M-L, Technologie, sécurité et qualité des aliments : introduction à la qualité et la sécurité des aliments : aspects chimiques. Contrôle des résidus et des médicaments Vétérinaires, page 2-36. Université de Liège, faculté de médecine vétérinaire, 2008. http://www.adaoa.ulg.ac.be/

56. Scippo. M-L, Maghuin-Rogister. G, Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse. Méthodes biologiques de dépistage, *Ann. Méd. Vét.*, 2006,150, 125-130.

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

58. Site 1 : Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 2007. http://www.bacteriologie.net/index.html

59. Site 2: Antibiothérapie 1 & 2, 2005.
http://ifsi.ch-hyeres.fr/IMG/pdf/Antibiotherapie.pdf

60. Site 3 : Antibiotiques. Cours de Bactériologie Générale. Faculté de Médecine COCHINPORT-ROYAL, Université de Paris, 2006.
http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio1.html

61. Site 4 : Cours de pharmacologie, Chimiothérapie anti-infectieuse. Institut de Pharmacologie et Toxicologie, p. 3-46, 2005-2006.
www.unil.ch/webdav/site/dpt/shared/BachelorMaster/8semestre/LS_antibiotiques1_06.pdf.

62. Site 5 : Cours Pharmacologie DCEM1, Université de Paris-VI. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie. P. 307-320, 2006.
http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/Pharmaco.pdf

63. Site 6 : Pharmacologie des Antibiotiques. Cours de Pharmacologie DCEM3. Centre d'Investigations Cliniques, p. 2-60, 2008.
http://www.medecine.univparis7.fr/DCEM3/documents/pharmacologie_module17/Pharmacologie%20des%20Antibiotiques.pdf

64. Site 7 : Pharmacologie des antibiotiques (DCEM I), p. 2-187, 2005.
www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio_oct2005.ppt.

65. Site 8 : Pharmacocinétique et modalités d'administration des antibiotiques, Laboratoire de Pharmacocinétique et de Pharmacie Clinique EA 525, Université V. Segalen Bordeaux 2 et Pharmacie centrale, hôpital Haut-Lévêque CHU de Bordeaux**,** page 2-4, 2006. http://www.infectiologie.com/site/medias/JNI/JNI06/IDE/ati1-Saux.pdf

66. Site 9: Test à large spectre pour la détection de substances antimicrobiennes dans la viande, page 1-2. Fiche de produit. DSM Nutritional Product, 2006. www.premitest.com,http://www.dsm.com/en_US/downloads/premitest/PremiTest_ScreeningtestmeatF rans_DNP.pdf

67. Site 10 : Antibiotiques. Les antibiotiques sont de précieux alliés à préserver, page 24-32, 2003. http://www.simv.org/Publications/Guide-Medicament/P24-32.pdf

68. Site 11: Wikipédia, l'encyclopédie libre. http://fr.wikipedia.org/wiki/Antibiotique.

70. Site 12 : www.delvotest.com.

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 25º C

1.2. Préparation :

- Mettre 40g de soja en poudre dans 1litre d'eau distillée chauffée.
- Distribuer en flacon de 500ml.
- Stériliser dans l'autoclave 120°C pendant 15-20 min.
- Couler les boites de pétri.

2. Milieux à pH fixe

2.1. Composition :

A. Test agar, pH6 :

- Peptones de caséine, digestion trypsique : 3,45g/l
- Peptone de viande, digestion trypsique : 3,45g/l
- Chlorure de sodium : 5,0g/l
- Agar-agar :13g/l

B. Test agar, pH7.4 :

- Peptones de caséine, digestion trypique : 3,45g/l
- Peptone de viande, digestion trypsique : 3,45g/l
- Chlorure de sodium : 5,0g/l
- Trisodium phosphate ($12H_2O$) :0, 35g/l
- Agar-agar :13g/l

C. Test agar, pH8 :

- Peptones de caséine, digestion trypsique : 3,45g/l
- Peptone de viande, digestion trypsique : 3,45g/l
- Chlorure de sodium : 5,0g/l
- Trisodium phosphate ($12H_2O$) :1,17 g/l
- Agar-agar :13 g/l

2.2. Préparation:

- Dissoudre toutes les pesées dans un volume d'eau distillée nécessaire.
- Chauffer le milieu jusqu'à la dissolution.
- Mettre cette gélose dans un flacon de stérilisation.
- Mettre les flacons dans l'autoclave à 120°C pendant 15 à 20 minutes.
- Laisser les flacons refroidir.

3. Mueller et Hinton:

3.1. Composition:

- Extrait de bœuf (viande) : 300ml
- Peptone de caséine : 17.5g
- Amidon de mais : 1.5g
- Agar : 17.0g
- pH=7.4

Ces ingrédients sont mélangés, le mélange est déshydraté.

3.2. Préparation :

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

4. Mannitol-Mobilité:

4.1. Composition :

- Peptones de caséine: 10 g/l
- Potassium nitrate : 1 g/l
- Agar-agar : 3.5 g/l
- Mannitol : 7.5 g/l
- Rouge de phénol : 0.04 g/l

4. 2. Préparation :

- Dissoudre toutes les pesées dans un volume d'eau distillée nécessaire.
- Bouillir le milieu jusqu'à la dissolution.
- Mettre cette gélose dans un flacon de stérilisation.
- Mettre les flacons dans l'autoclave à 120°C pendant 15-20 minutes.

- Laisser les flacons refroidir, et les placer ensuite à l'étuve à (+45°C) afin répartir le milieu dans les tubes.

5. Chapman:

5.1. Composition :

- Peptone : 10,0 g/l
- Extrait de viande de bœuf : 1,0 g/l
- Chlorure de sodium: 75,0 g/l
- Mannitol : 10,0 g/l
- Rouge de phénol : 0,025 g/l
- Agar-Agar :15,0 g/l
- *pH = 7,4*

5.2. Préparation:

- Peser 111 g du mélange.
- Dissoudre dans un litre de milieu (avec chauffage).
- L'autoclavage est classique (à 120°C pendant 15-20 minutes).

6. Gélose nutritive:

6.1. Composition

- Extrait de viande : 1,0g/l
- Extrait de levure : 2.5g/l
- Peptone : 5,0g/l
- Chlorure de sodium : 5,0g/l
- Agar : 15,0g/l
- pH = 7,0

6.2. Préparation

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

Composition et Préparation des Solutions Standards des antibiotiques

Afin de vérifier que les conditions de manipulation sont correctes, notamment le développement et la sensibilité du micro-organisme, nous avons préparé les solutions d'antibiotiques témoins de Pénicilline, Dihydrostreptomycine, Erythromycine, Sulfathiazol et Enrofloxacine. Le Triméthoprime est utilisé comme additif (à 0.01%) au milieu ensemencé avec *Bacillus subtilis* à pH 7,4, ce qui permet la détection des Sulfamides par la méthode des quatre boites grâce à la synergie Triméthoprime-Sulfamides.

1. Solution de Pénicilline:

Dissoudre 61mg de Pénicilline G sodique dans 100ml d'eau distillée en utilisant une fiole jaugée de 100ml. Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère au 1 /5000 en effectuant deux dilutions successives, pour avoir une concentration finale égale à 0,2 UI de Pénicilline/ml, **la solution mère doit être utilisée le jour même.**

- La première au 1/100 ;
- La deuxième au 1/50.

2. Solution de Sulfathiazol :

Dissoudre 55mg de Sulfathiazol dans 5ml de NaOH 0,1N et ajuster à 50ml avec l'eau distillée stérile dans une fiole jaugée. Pour avoir une concentration de la solution finale égale à 4µg/ml, diluer la solution mère au moment de l'emploi à la 1/25. **La solution mère peut être conservée entre 4C° et 6C° pendant une semaine.**

3. Solution d'Erythromycine:

Dissoudre 54mg d'Erythromycine dans 3ml de méthanol et ajuster à 50ml de l'eau distillée stérile dans une fiole jaugée. Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère au 1/4000 on effectuant deux dilutions successives, pour avoir une concentration égale à 0,25µg/ml :

- La première au 1/200;
- La deuxième au 1/20.

La solution mère peut être conservée pendant deux semaines.

4. Solution de Dihydrostreptomycine:

Dissoudre 50mg de Dihydrostreptomycine dans l'eau distillée de 50ml dans une fiole jaugée. Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère au 1/200. Pour avoir une

concentration finale de 5µg de Dihydrostreptomycine/ml. La solution mère peut être conservée entre +4°C - +6°C.

5. Solution d'Enrofloxacine:

On a dissout 50 mg de matière active dans 1 ml de NaOH 1N, puis on a ajusté à 50 ml de l'eau dans une fiole jaugée ambrée. Après une dilution de la solution mère au 1/1250 correspondant à une concentration finale égale à 800µg/l. Nous avons conservé la solution mère entre +4°C et +8°C.

- La première au 1/50 ;
- La deuxième au 1/25 ;

6. Solution de Triméthoprime :

Dissoudre 55mg de Triméthoprime dans 5ml d'acide acétique à 5% et ajuster à 500ml avec de l'eau distillée stérile dans une fiole jaugée. Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère au 1/20, la concentration finale est alors de 5µg/ ml. La solution mère peut être conservée au réfrigérateur pendant 14jours.

Remarque : D'autres solutions d'antibiotiques ont été utilisées dans le test de la sensibilité des souches utilisées (antibiogramme): Ampicilline 0,2 mg/ml, Tétracycline (Chlorotétracycline) 0,6 mg/ml, Streptomycine 10 mg/ml, Pénicilline G 0,12 mg/ml, Enrofloxacine 0,1mg/ml, Sulfamide (Sulfathiazol) 4 mg/ml, Erythromycine 0,3 mg/ml, Amoxicilline 0,5 mg/ml, Oxacilline 0,1 mg/ml, Gentamycine 0.3 mg/ml. La charge de ces solutions varie selon la charge du disque utilisé dans ce test.

Résultats des analyses des échantillons prélevés par les méthodes officielles.

			Diamètre de la zone annulaire (mm)				
			B. lactamines ou Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	B. lactamines et Macrolides	Quinolones
Echantillon	Nature de la matrice	Prémi®test	*B. subtilis* pH6	*B. subtilis* pH7.4	*B. subtilis* pH 8	*M. luteus* pH8	*E. coli* pH8
E 1	Bovin	Violet	3	2	4	0	5
E 2	Bovin	Violet	0	3	4	0	6
E 3	Bovin	Violet	0	2	3	0	2
E 4	Bovin	Violet	0	2	4	0	5
E 5	Bovin	Violet	0	7	2	0	9
E 6	Bovin	Violet	3	0	2	0	4
E 7	Bovin	Violet	0	5	5	0	3
E 8	Bovin	Violet	4	4	6	0	7
e 1	M. poulet	Violet	0	0	4	0	2
e 2	M. poulet	Violet	2	1(douteux)	2	0	0
e 3	M. poulet	Violet	0	0	2	0	0
e 4	M. poulet	Violet	0	0	2	0	0
e 5	M. poulet	Violet	3	7	6	0	5
e 6	M. poulet	Violet	0	0	0	0	4
e 7	M. poulet	Violet	2	0	4	0	0
e 8	M. poulet	Violet	0	0	3	0	0
e 9	M. poulet	Violet	3	3	2	0	6
e 10	M. poulet	Violet	0	0	0	0	7
F 1	Foie	Violet	3	0	0	0	0
F 2	Foie	Violet	2	0	0	0	0
F 3	Foie	Violet	3	0	0	0	0
Echantillons Douteux							
e10	M. poulet		1	0	0	0	0
e11	M. poulet		1	0	0	0	0
e12	M. poulet		1	0	0	0	0
F4	Foie		1	0	0	0	0
F5	Foie		0	0	0	0	1
F6	Foie		0	0	0	0	1

Introduction Générale

Partie Bibliographique

Partie expérimentale

Matériels

Et

Méthodes

Résultats

Et

Discutions

Conclusion

Bibliographie

Annexes

Actuellement, le recours aux antibiotiques est fréquent en production animale: systématiquement en élevage de poulet de chair, à titre thérapeutique et préventif en élevage bovin et ovin.

L'utilisation correcte de certains antibiotiques comme promoteurs de croissance ne doit pas entrainer de résidus. Par contre leur administration dans le but préventif ou thérapeutique surtout lorsqu'elle est réalisée par des profanes doit faire craindre la substance particulièrement actives dans la viande de cette espèce.

Outre les qualités nutritionnelles et organoleptiques, et pour être propre à la consommation humaine, la viande du bovin , ovin et poulet de chair doit être avant tout un produit sain, c'est-à-dire exempt de germes pathogènes, mais aussi de résidus des médicaments et plus spécialement de résidus d'antibiotiques qui sont dangereux pour la santé humaine .

L'analyse de cette denrée alimentaire est donc nécessaire afin de garantir la maitrise de la qualité (ou de la conformité) d'un point de vue sanitaire ou purement commercial. Cependant, les contrôles des résidus de ces substances dans la denrée mise à la vente sont trop rares voire inexistants dans l'Algérie, d'où la nécessité de prévoir des dispositifs adéquats de détection de ces résidus qui répondent aux critères technique (limite de détection, reproductibilité, répétabilité …) et économiques.

Plusieurs méthodes microbiologiques de référence ont été validées au dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des viandes destinées à la consommation humaine. Certaines sont qualifiées de méthodes de Présélection (screening) (exemple le Prémi®test) et d'autres sont des méthodes de confirmations, qui sont plus complexe, mais plus sélectives (méthode des quatre boites, méthode STAR). Cependant, ces dernières sont qualifiées des méthodes lourdes sur le plan technique et économique.

Notre travail est basé sur une mise au point de méthodes microbiologiques alternatives, efficaces et peu coûteuses pour la recherche des résidus d'antibiotique dans les viandes rouges (bovine et ovine) et les viandes blanches (foie et muscle de poulet chaire). Pour cela nous avons fixés les objectifs suivants:

Dans la première partie de notre travail nous avons résumé les principales données bibliographiques récentes relatives au thème abordé : des généralités sur les antibiotiques, les normes liées à leur utilisation au niveau des élevages ainsi que leurs effets sur la santé du

consommateur et leurs méthodes de dépistage au niveau des denrées alimentaires d'origines animales.

La partie expérimentale consiste dans une première partie au dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau de 95 échantillons : 30 échantillons de Bovins, 13 échantillons d'ovin, 1 échantillon de caprin ,31 bréchets et 20 foies prélevés dans les régions du centre de l'Algérie, et ce par deux méthodes de référence:

✓ le Prémi®Test : il s'agit d'un dépistage global des résidus d'antibiotiques,

✓ la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR, une méthode détaillée qui détecte six familles d'antibiotiques: les béta-lactamines, les sulfamides, les macrolides, les aminosides, les quinolones et les tétracyclines.

En parallèle, une enquête sur terrain a été 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 de bovin, d'ovin et de poulet de chair en Algérie.

Dans un deuxième volet de notre travail, nous nous sommes intéressés à la mise au point de deux méthodes multi-résidus pour le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des échantillons détectés comme positives par les deux méthodes de références:

✓ une méthode en une seule boite qui repose sur le principe d'inhibition de la croissance autours d'un disque de viande,

✓ une autre méthode en tube qui 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 différents paramètres pris en compte pour cette mise au point sont :

✓ la sensibilité des souches utilisées et la nature du milieu, pour la première méthode;

✓ le choix de l'indicateur colorée, la charge de l'inoculum, la duré d'incubation, et la hauteur (ou le volume) du milieu, pour la deuxième méthode.

Enfin, cette mise au point ne constitue qu'un début à des études plus détaillées visant la validation de ces méthodes.

1. HISTORIQUE

La découverte des antibiotiques revient à sir FLEMING Alexander en 1929. Au cours d'examens de routine des cultures de *Staphylocoques* en boites de Pétri au « saint mary's hospital » de Londres, il découvre le développement accidentel de certaines moisissures de *Penicillium notatum* autour des quelles les colonies bactériennes ne cultivaient pas. Il émit l'hypothèse que ce champignon devait secréter une substance nuisible à la croissance des *Staphylocoques* et il a démontré que le bouillon filtré de ce champignon permet de reproduire ce phénomène. Il a donné à ce produit qui a pu empêcher la croissance de ces bactéries le nom pénicilline qui est introduit en thérapeutique pendant la deuxième guerre mondiale (1941).

Parallèlement sont préparés en 1935, les sulfamides, le premier groupe d'antibactériens artificiels. Par la suite de nombreux autres antibiotiques ont été isolés à partir de champignons inférieurs, mais aussi et surtout des bactéries telluriques (genre *Actinomyces*, *Bacillus* ...) les plus productrices d'antibiotiques. Les tétracyclines sont découvertes dans les années 1950, *(Duval et Soussy, 1990 ; Puyt et Guérin-Faublée, 2006)*. Le **tableau 1** résume les dates de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles.

Tableau 1: Date de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles.

(Site 7, 2005; Chatellet, 2007; Site 6, 2008).

Micro-organisme	Famille	Molécule	Date de découverte
Penicillium	Pénicillines	Pénicilline	1929
Streptomyces	Aminoglycosides	Streptomycine Néomycine Kanamycine Tobramycine Amikacine	1944 1949 1957 1967 1975
	Tétracyclines	Chlorotétracycline Oxytétracycline	1948 1949
	Quinolones	Acide nalidixique	1962
Cephalosporum	Macrolides	Chloramphénicol	1946
	Phénicolés	Erythromycine	1952
	Céphalosporines	Céphalotine	1954

2. DEFINITION D'UN ANTIBIOTIQUE

Un antibiotique est par définition "toute substance chimique produite par des microorganismes ayant le pouvoir d'inhiber et de détruire les bactéries et d'autres microorganismes en solution diluée". Ils sont actuellement obtenus en laboratoire par synthèse ou semi-synthèse.

- Les antibiotiques synthétiques sont obtenus soit à partir de dérivés artificiels, soit en recréant des substances primitivement extraites de microorganismes.
- Les antibiotiques semi synthétiques sont obtenus en modifiant en laboratoire une substance produite par un micro-organisme *(Site 11)*.

3. EFFET BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE DES ANTIBIOTIQUES

Selon *H. Leclerc et al, 1983*, on distingue deux grandes catégories ou classes d'antibiotiques:

- Bactériostatiques : antibiotiques inhibant la croissance bactérienne, action suffisante pour arrêter le processus infectieux. Parmi ces antibiotiques, on retrouve les tétracyclines, les sulfamides, les macrolides et les phénicoles.
- Bactéricides : antibiotiques tuant la bactérie. Cette activité des antibiotiques est évaluée grâce à deux paramètres : la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et le FIC (Fractional Inhibitory Concentration) qui est le rapport de la concentration sérique de l'antibiotique à la CMI vis-à-vis de la bactérie. Parmi cette classe d'antibiotique, on cite les β-lactamines, aminosides, les quinolones, la vancomycine, les teicoplanines.

4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES

4.1. Critères de classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères (*Duval et Soussy, 1990*; *Site 3, 2006*; *Fontaine, 1992)*:

- ✓ leur origine (bio synthétisés par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, issus du génie chimique),
- ✓ leur composition chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques),
- ✓ leur activité (antibactériens, antifongiques, antimitotiques). Nous nous intéresserons ici uniquement aux antibiotiques à activité antibactérienne,
- ✓ leur mode d'action,
- ✓ leur modalité d'action.

De toutes ces classifications possibles, la classification la plus courante est celle par famille, possédant un certains nombre de caractères communs: composition chimique ou origine, spectre d'action similaire ou très rapproché, cibles bactériennes identiques, résistance bactérienne et sensibilisation croisée, effets indésirables rapprochés, etc.… (*Duval et Soussy, 1990*; *Maur, 1990*).

4.2. Classification des antibiotiques selon leur origine

Les anti-infectieux peuvent être produits de trois façons, par fermentation (naturelle), par semi-synthèse ou par synthèse chimique.

4.2.1. Fermentation ou extraction

Les antibiotiques sont fondamentalement des substances naturelles issues du métabolisme azoté de divers micro-organismes (*Maur, 1990; Mevius et al, 1999; Puyt et Guérin-Faublée, 2006*) :

✓ soit des champignons inferieurs (*mycètes*) : du genre *Penicillium* pour les Pénicillines et genre *Cephalosporium* pour les Céphalosporines.

✓ soit des bactéries : du genre *Streptomyces* (90 % des antibiotiques sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*) et genre *Bacillus*. Comme antibiotiques dont l'origine est bactérienne on trouve, la Bacitracine, Polymyxine-Colistine, Mupirocine, Céphamycines, Monbactames (les Monbactames obtenues initialement par extraction, sont obtenues actuellement par synthèse).

4.2.2. Semi-synthèse

Les antibiotiques ainsi produits par voie fermentaire sont parfois utilisés pour la préparation de dérivés artificiels voisins qu'on ne peut pas obtenir par fermentation. Dans ce but, on fait subir certains traitements chimiques simples à des antibiotiques produits par voie fermentaire, notamment des hydrolyses pour séparer la partie fondamentale de la molécule. On greffe ensuite sur ce squelette de base différents groupements particuliers grâce à des estérifications ou des amidifications.

On obtient ainsi des antibiotiques par semi-synthèse (cas des pénicillines ou des céphalosporines). Certains sont des pro-drogues antibiotiques, totalement dénuées par elles-mêmes d'activité biologique mais qui acquièrent leur pouvoir antimicrobiens après hydrolyse de la fonction ester qui a été greffée (*Mevius et al, 1999; Puyt et Guérin-Faublée, 2006*).

4.2.3. Synthèse chimique totale

Certains antibiotiques dont la structure est assez simple sont produits plus économiquement par synthèse que par fermentation. C'est le cas des Florphénicols, Chloramphénicols, Monobactames, Sulfamides, Triméthoprime, Quinolones, et les Nitrofuranes, etc.

Le fait que certains antibiotiques (Chloramphénicol, Aztréonam etc.) obtenus au début par fermentation sont actuellement produits par synthèse chimique, fait de plus en plus disparaître la distinction initiale entre antibiotiques et agents antibactériens de synthèse, (*Maur, 1990; Puyt et Guérin-Faublée, 2006*).

4.3. Classification des antibiotiques selon la structure chimique (Figure. 1)

La diversité en structure chimique de certains antibiotiques implique ces différents effets sur la cellule bactérienne. De façon générale, on peut citer différentes structures chimiques de certains antibiotiques *(Site 3, 2006)* :

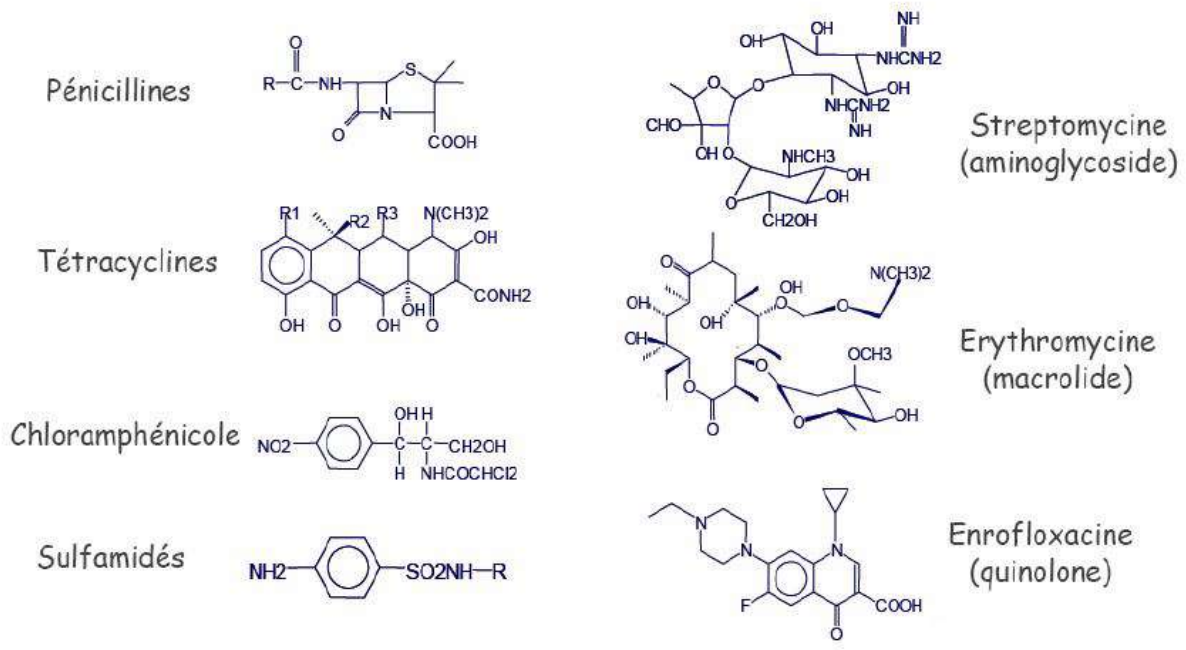


Figure 1 : Structure chimique de certaines molécules antibactériennes.

4.4. Classification des antibiotiques selon le mode d'action (selon la cible bactérienne)

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. Cette grande

spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à des très faibles concentrations. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés **(Figure.2)** *(Mevius et al, 1999 ; Oxoby, 2002 ; Site 2, 2005 ; Site 4, 2006 ; Cuq, 2008)* :

-sur la paroi bactérienne,

-sur la membrane plasmique,

-sur les ribosomes,

-sur l'ADN, ….

4.4.1. Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

En inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire. Privées de leur paroi, les bactéries deviennent molles, fragiles et sans défense vis-à-vis des agressions mécaniques et des perturbations osmotiques ; on les appelle alors des protoplastes ou sphéroplastes, et leur vie est brève (*Maur, 1990; Bourin et al, 1993; Site 3, 2006*).

4.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane cellulaire

Ces antibiotiques agissent même sur les bactéries en phase de repos. Ils exercent une action directe et immédiate sur la membrane cytoplasmique en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur. Cette action est comparable à celle des antiseptiques surfactifs. Parmi ces antibiotiques, on trouve la tyrothricine, les polypeptides cycliques, poly myxines, colistine...etc., (*Bourin et al, 1993 ; Maur, 1990 ; Site 3, 2006*).

4.4.3. Antibiotiques agissant sur les ribosomes

Ces antibiotiques entraînent l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales en exerçant *(Maur, 1979 et 1990 ; Site 3, 2006)*:

- une inhibition au niveau des sous unités 30S des ribosomes: Aminoglycosides (lecture de l'ARNm est perturbée),

- une inhibition au niveau des sous unités 50S des ribosomes: soit par inhibition du site A (aminoacyl) avec translocation perturbée (cas des macrolides), soit par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN (cas des tétracyclines), soit par inhibition du facteur

d'élongation EF-G (cas de l'acide fusidique), soit enfin par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN et l'inhibition de la peptidyltransférase pour les Phénicolés.

4.4.4. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse des acides nucléiques

Ces antibiotiques inhibent soit (*Site 3, 2006*):

✓ la réplication de l'ADN : inhibition de l'ADN-gyrase ou topoisomérase II (sous unité A), c'est le cas des quinolones,

✓ la transcription de l'ARN : inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante (sous unité B), c'est le cas des rifamycines.

4.4.5. Antibiotiques agissant par autres mécanismes

Ces antibiotiques agissent en tant qu'anti-métabolites bactériens en inhibant une des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries. C'est le cas des sulfamides, Triméthoprime (qui inhibent la dihydroptéroate synthétase: DHPS), et les isoniazides (analogues structuraux du NAD) (*Site 3, 2006*).

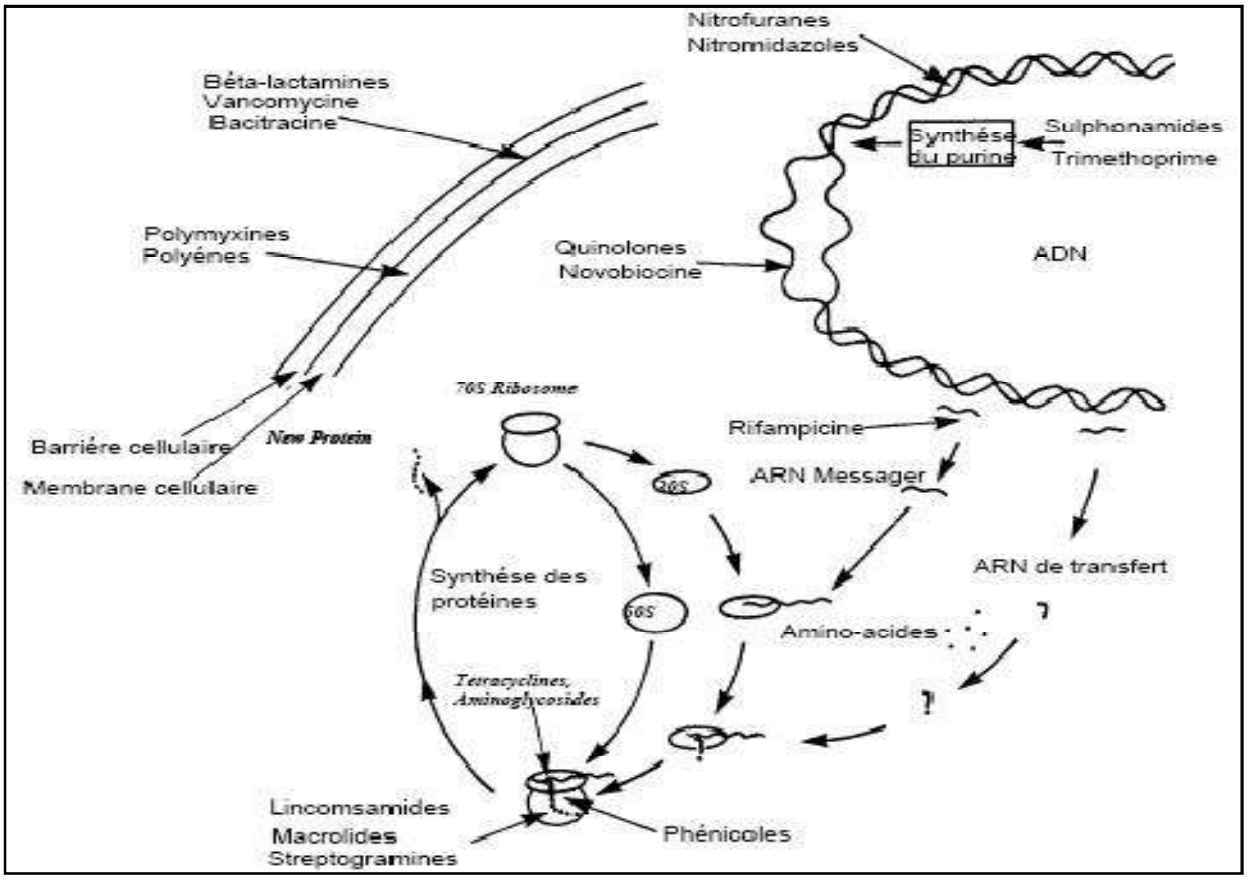


Figure 2 : Principaux sites d'action des antibiotiques *(Mevius et al, 1999; Oxoby, 2002 ; Errecalde, 2004; Site 4, 2006; Puyt et Guérin-Faublée, 2006; Cuq, 2008).*

4.5. Classification des antibiotiques selon la structure le spectre d'action

Chaque antibiotique est caractérisé par un spectre qui correspond à l'éventail des germes qu'il peut toucher, à dose plus ou moins élevée. Il est différent pour chaque famille d'antibiotiques, bien qu'il puisse se recouper, en partie ou en totalité, avec celui d'autres antibiotiques, c'est à dire que les mêmes germes peuvent être sensibles à plusieurs antibiotiques à la fois. Nous avons ainsi des antibiotiques à spectre très large, large, moyen, ou étroit (*Maur, 1979*).

4.6. Classification des antibiotiques par famille

Les antibiotiques sont divisés en familles (**Tableau 2**) ; le classement n'est pas tout à fait cohérent, puisque le point commun des divers antibiotiques d'une classe peut être tantôt chimique (les β-lactamines, les sulfamides, les polypeptidiques, les aminosides, les macrolides, les fluoroquinolones), tantôt une bactérie sur laquelle ils sont efficaces (les antituberculeux, les antistaphylococciques). Il peut s'y rajouter une notion de moment d'apparition : ex : céphalosporines de $1^{ère}$, de $2^{ème}$, …. génération.

Les familles chimiques contiennent plusieurs molécules, dont les spectres d'action sont semblables, mais non identiques, et les effets indésirables sont assez voisins. D'où l'intérêt de savoir toujours situer un antibiotique dans sa classe, même si les différentes molécules d'une classe peuvent parfois être très différents en terme de devenir dans l'organisme, (*Site 5, 2006*).

Tableau 2 : Classification des antibiotiques par famille (*Gogny et Puyt, 2001*).

1- Bétalactamines

Antibiotiques bactéricides, actifs par voie orale (à l'exception de la benzylpénicilline ou pénicilline G), de distribution extracellulaire, caractérisés par une forte élimination urinaire.

1.1. Pénicillines

1.1.1. Pénicillines du groupe G

Spectre d'activité : bactéries à Gram positif et pasteurelles.

Sensibles aux ß-lactamases.

- Benzylpénicilline (pénicilline G), action immédiate : sel sodique ; action semi retard : sel de procaïne ; action retard : sel de benzathine
- Pénéthacilline (ester basique et lipophile dérivé de la pénicilline G qui favorise la distribution intracellulaire et l'élimination mammaire)

1.1.2. Pénicillines du groupe M

Spectre d'activité identique à celui de la benzylpénicilline mais étendu aux staphylocoques producteurs de ß-lactamases.

Résistantes aux pénicillinases staphylococciques.

Sel sodique d'action brève réservée au traitement des mammites en cours de lactation, sel de benzathine à action prolongée réservée au traitement des mammites hors lactation) :

- Oxacilline et Cloxacilline (sels sodique ou de benzathine),
- Dicloxacilline et Nafcilline (sels sodique).

1.1.3. Pénicillines du groupe A

Spectre d'activité élargi aux bactéries à Gram négatif.

Résistantes aux pénicillinases des bactéries à Gram négatif mais sensibles aux pénicillinases staphylococciques : Ampicilline, Amoxicilline.

1.2. Céphalosporines

Antibiotiques à large spectre antibactérien. Activité de plus en plus prononcée sur les bactéries à Gram négatif de la première à la quatrième génération.

Résistances accrue vis-à-vis des ß-lactamases par rapport aux pénicillines du groupe A.

Génération	Antibiotique
Première génération	Céfalexine Céfapirine Céfazoline
Deuxième génération	Céfalonium Céfuroxime
Troisième génération	Ceftiofur Céfopérazone
Quatrième génération	Cefquinome

1.3. Acide clavulanique

Bêtalactamine dépourvue d'action antibactérienne mais à forte activité inhibitrice sur les bêta-lactamases bactériennes, d'où un effet synergique en association avec les pénicillines et des céphalosporines. Seule l'association avec l'Amoxicilline est disponible.

Tableau 2: *suite*

2. Aminosides (aminocyclitols) Antibiotiques bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, non résorbés par voie digestive, à distribution extracellulaire et élimination urinaire. Spectre d'activité : étroit, essentiellement bactéries anaérobies à Gram négatif pour la plupart ; spectre large (bactéries à Gram positif et négatif) pour l a gentamicine. Inactives sur les bactéries anaérobies. Résistances se développant rapidement. - Dihydrostreptomycine, Framycétine, Kanamycine, Néomycine, Gentamicine, Apramycine - Spectinomycine (aminocyclitol apparenté aux aminosides, caractérisé par une action bactériostatique avec un spectre étendu aux mycoplasmes ainsi que par une moindre toxicité (néphrotoxicité et ototoxicité)
3. Tétracycline Antibiotiques bactériostatiques, à spectre large, résorbés par voie digestive. - Tétracycline, Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline
4. Phénicolés Antibiotiques bactériostatiques à large spectre, résorbés par voie digestive et à large diffusion dans l'organisme. - Chloramphénicol (antibiotique interdit chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR), Thiamphénicol (uniquement disponible en aérosols) et Florfénicol
5. Macrolides et apparentés
5.1. Macrolides Antibiotiques bactériostatiques, à spectre étroit surtout dirigé vis-à-vis des bactéries à Gram positif, des mycoplasmes, et pour certains composés vis-à-vis des pasteurelles, résorbés par voie digestive, à forte distribution intracellulaire et à fortes concentration dans les sécrétions acides (lait dans toutes les espèces, urine et salive des carnivores) - Érythromycine, Oléandomycine, Spiramycine (également additif), Tylosine (également additif), Josamycine, Tilmicosine
5.2. Apparentés aux macrolides Antibiotiques apparentés aux macrolides par leur activité antibactérienne. - Lincosamides (clindamycine et lincomycine), Rifamycines (rifaximine) - Pleuromutilines: antibiotiques actifs sur les mycoplasmes, les tréponèmes, *Hemophilus* et *Campylobacter*, résorbés par voie digestive. Tiamuline - Synergistines : virginiamycine (exclusivement additif) - Autres : novobiocine, acide fusidique

Tableau 2: *suite*

6. Antibiotiques polypeptidiques	
6.1. Polymyxines Antibiotiques bactéricides à spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif, non résorbés par voie digestive, à distribution extracellulaire et élimination urinaire. - Colistine (polymyxine E), Polymyxine B (usage local exclusivement)	
6.2. Antibiotiques polypeptidiques non tensio-actifs Antibiotiques bactériostatiques à spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram positif, non résorbés par voie digestive. - Bacitracine (additif également sous forme de sel de zinc) - Tyrothricine, Thiostrepton (antibiotique polypeptidique soufré)	
7. Sulfonamides antibactériens Dérivés de l'acide para-amino-benzoïque, bactériostatiques, à large spectre d'activité antibactérienne (bactéries à Gram positif et négatif) ainsi que parfois anticoccidienne, en majorité résorbés par voie digestive.	
7.1. Sulfonamides d'action générale	
7.1.1. Sulfamides à brève durée d'action (3 à 6 heures) - Sulfamérazine, Sulfadimidine (sulfadimérazine)	
7.1.2. Sulfamides semi-retard (6 à 10 heures) - Sulfapyridine, Sulfaméthoxazole, Sulfanilamide, Sulfadiazine	
7.1.3. Sulfamides retard (10 à 24 heures) - Sulfaméthoxypyridazine, Sulfadiméthoxine, Sulfadoxine.	
7.2. Sulfonamides d'action digestive Sulfamides pratiquement pas résorbés par voie digestive. - Sulfaguanidine, Phtalylsulfathiazole.	
7 .3. Sulfamides cocccidiostatiques	
8. Diaminopyrimidines Antibactériens bactériostatiques à large spectre d'activité, possédant une synergie d'action (effet bactéricide) en association avec des sulfamides, bien résorbés par voie orale et présentant une distribution intracellulaire : Triméthoprime, Baquiloprime.	
9. Quinolones Antibactériens bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, bien résorbés par voie orale.	
Génération	**Antibiotique**
Première génération	Acide oxolinique : Spectre antibactérien étroit (bactéries à Gram négatif : entérobactéries).
Deuxième génération	Fluméquine : Spectre antibactérien plus large (bactéries à Gram négatif et à Gram positif), distribution tissulaire élargie.
Troisième génération	Enrofloxacine, Marbofloxacine, Danofloxacine, Difloxacine et sarafloxacine (en développement)) : Spectre antibactérien large, y compris sur les mycoplasmes ; excellente distribution tissulaire et action à très faible concentration.

Tableau 2: *suite*

10. Nitrofuranes Composés bactériostatiques à spectre large, tous interdits chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR. Nitrofuranes d'action générale : Résorbés par voie digestive. Furaltadone, Nitrofurantoïne (action urinaire). Nitrofuranes d'action locale digestive : Peu absorbés par voie digestive, mais risques d'intoxication lors de surdosage (chez veaux et volailles) : Furazolidone.
11. Nitro-imidazoles Activité mixte à la fois antibactérienne à spectre étroit (aérobies à Gram positif, anaérobies à Gram positif et négatif, fusiformes et spirochètes : *Treponema hyodysenteriae, Fusiformis*) et antiparasitaire protisticide (*Trichomonas, Histomonas, Balantidium*). Le dimétridazole et le ronidazole (prochainement le métronidazole) sont interdits chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR. Les autres nitro-imidazoles utilisés comme médicaments en productions animales seront interdits au 1er janvier 98, si des LMR ne sont pas fixés rapidement avant cette date. À noter toutefois que ces interdictions ne portent pas sur les utilisations des nitro-imidazoles comme additif en alimentation animale. - Dimétridazole (aussi additif), Métronidazole (carnivores domestiques), Ronidazole (aussi additif), Carnidazole (pigeons), Ipronidazole (exclusivement additif).
12. Hydroxyquinoléines Composés bactériostatiques, spectre d'activité large (bactéries à Gram positif et négatif, protozoaires, certains champignons, utilisés essentiellement en antisepsie externe : Oxyquinol (oxyquinoléine), Clioquinol (chloroiodoquine).
13. Polyéthers ionophores (exclusivement additifs) Antibiotiques à la fois antibactériens bactéricides, à spectre étroit (bactéries à Gram positif), et antiprotozoaires (anticoccidiens), utilisés exclusivement à titre d'additifs alimentaires comme facteurs de croissance et anticoccidiens. - Monensin, Lasalocide, Narasin, Salinomycine, Maduramycine, Avilamycine, Semduramicine (additif en développement).
14. Quinoxaline N-dioxydes (exclusivement additifs) Facteurs de croissance à large spectre antibactérien utilisés uniquement en tant qu'additifs : Carbadox, Olaquindox.
15. Antibiotiques divers - Avoparcine, Flavophospholipol et Efrotomycine (exclusivement additifs).

5. USAGES DES ANTIBIOTIQUES DANS L'ELVAGE D'ANIMAUX

5.1. Objectifs

Selon *Bezoen et al, 1999*; *Guillemot, 2006*; *Jacquemin, 2006*, les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs variables:

- les antibiotiques sont tout d'abord utilisés à titre thérapeutique. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. 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 .

- 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.

- les antibiotiques peuvent, parfois, être administrés à des périodes critiques de leur vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue, après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire. 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. L'antibioprophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes.

- l'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance a fait l'objet de nombreuses critiques. Il est très limité actuellement et été totalement abandonné en fin 2005 en Europe. Ces antibiotiques régulateurs de la flore (ARF) ou antibiotiques promoteurs de croissance (AGP pour antibiotic growth promotors) sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et sont tous des agents chimio-thérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur.

Le **tableau 3** résume les principaux types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à la consommation humaine.

Tableau 3: Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine (*Kirkpatrick, 2002*).

Type d'utilisation	**But**	**Voie ou mode d'administration**	**Administration individuelle /par groupe**	**Animaux malades**
Thérapeutique	Thérapie	Injection, aliments, eau	Individuelle ou par groupe	Animaux malades ou certains animaux dans des groupes
Métaphylactique	Prophylaxique Thérapeutique	Injection : veaux en parc d'engraissement , aliments, eau.	Groupe	Certains
Prophylaxie	Prévention de la maladie	Aliments	Groupe	Rien d'évident, bien que certaines infections puissent être subcliniques
Stimulateur de Croissance	Stimulation de la croissance	Aliments	Groupe	Aucun
	Indice de consommation	Aliments	Groupe	Aucun

5.2. Les molécules utilisées en élevages d'animaux

Le **tableau 4** présente les molécules utilisées en médecine humaine et précise si elles sont également utilisées chez l'animal. A titre d'exemple, le **tableau 5** précise les principaux antibiotiques utilisés en élevage avicole.

Tableau 4 : Les molécules d'antibiotiques utilisées en médicine humaine et vétérinaire (*Colatrella, 2000 ; Chatellet, 2007*).

Famille	Sous-famille	Molécule(s)	Usage chez l'Homme	Usage chez l'animal
Béta-lactamines	Pénicillines	Pénicilline G	X	X
		Pénicilline V	X	
		Pénicilline M	X	X
		Pénicilline A	X	X
		Carpoxypénicilline	X	
		Uréidopénicilline	X	
	Céphalosporines	Première génération	X	X
		Deuxième génération	X	X
		Troisième génération	X	X
		Monobactames	X	
Cyclines			X	X
Aminosides			X	X
Macrolides			X	X
Apparentés aux Macrolides	Lincosamides		X	X
	Kétolides		X	
	Synergsitines/streptogramines		X	
Quinolones	Première génération		X	X
	Deuxième génération		X	X
Furanes			X	X
Phénicolés			X	X
Triméthoprimes			X	X
Polymoxines			X	X
Sulfamides			X	X
Glycopeptides			X	
Imidazolés			X	X
Antituberculeux			X	X
Divers		Acide fusidique	X	X
		Bacitracine	X	X
		Clofazimine	X	
		Dapsone	X	
		Fosfomycine	X	
		Fumagilline	X	
		Mupirocine	X	
	Oxazilidinones	Linézolide	X	
		Thyroricine	X	X

Tableau 5: Les principaux antibiotiques utilisés en aviculture.

(*Mogenet et Fedida, 1998 cité dans Messai, 2006*).

Famille	Exemples
Bêta-lactamines	Aminopénicillines : Ampicilline et Amoxycilline
	Céphalosporines : Ceftiofur
Aminosides et apparentés	Dihydrostreptomycine (DHS), Gentamycine, Néomycine, Spectinomycine, Framycétine
Quinolones	Acide oxolinique, Fluméquine, Enrofloxacine, Difloxacine, etc
Tétracyclines	Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline
Polypeptides	Colistine (polymyxine E)
Macrolides et apparentés	Érythromycine, Josamycine, Lincomycine, Spiramycine, Tylosine, Tilmicosine, Tiamuline (pleuromutiline)
Sulfamides	Sulfadiazine, Sulfadimidine, Sulfadiméthoxine, Sulfaquinoxaline
Diaminopyrim-idines	Triméthoprime

5.3. Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs

L'utilisation des antibiotiques en tant qu'additif dans l'alimentation des élevages constitue une cause majeure de leurs présences au niveau des denrées alimentaires d'origines animales à des teneurs supérieures à la LMR.

5.3.1. Définition d'additifs

Un additif est défini selon l'Union Européenne comme étant toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique au stade de leur fabrication, transformation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage, a pour effet qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires (*Pujol-Dupuy, 2004*).

5.3.2. Effets des additifs

Selon *Guillemot, 2006*, les additifs sont ajoutés aux aliments pour animaux ou à l'eau pour remplir notamment une ou plusieurs des fonctions suivantes:

- avoir un effet positif sur les caractéristiques des aliments destinés aux animaux,

- avoir un effet positif sur les caractéristiques des produits d'origine animale,
- répondre aux besoins nutritionnels des animaux,
- avoir un effet positif sur les conséquences environnementales sur la production animale,
- avoir un effet positif sur la production, le rendement ou le bien être des animaux notamment en influençant la flore gastro-intestinale ou la digestibilité des aliments par les animaux,
- Dans ce contexte, l'utilisation des 4 antibiotiques (Monensin: E714, Salinomycine: E716, Avilamycine: E717et Flavophospholipol: E712) a été supprimée en fin 2005. Il est important de noter que certains additifs antibiotiques sont encore largement utilisés dans différents pays. A titre d'exemple, les données disponibles pour la France sont présentées sur le **tableau 6**.

Tableau 6: Les principaux additifs antibiotiques utilisés jusqu'à 2005 (*Guillemot, 2006*).

Molécule	Animaux	Teneur en ppm dans l'aliment complet	Age maximal d'administration
Orthosomycines Avilamycine (E717)	Porcelets	20 à 40	4 mois
	Porcs	10 à 20	6 mois
	Poulets d'engraissement	2.5 à 10	-
	Dindons	5 à 10	-
Bambermycines Flavophospholipol (E712)	Poules pondeuses	2 à 5	-
	Dindons	1 à 20	26 semaines
	Toutes volailles sauf canards, oies, pigeons	1 à 20	16 semaines
	Porcelets	10 à 25	3 mois
	Porcs	1 à 20	6 mois
	Animaux à fourrure sauf lapin	2 à 4	-
	Veaux	6 à 16	6 mois
	Bovins à l'engrais	2 à 10	-
	Lapins	2 à 4	-
Ionophores polyéthers Salinomycine (E716)	Porcelets	30 à 60	4 mois
	Porcs	15 à 30	6 mois
Monensin (E714)	Bovins à l'engrais	10 à 40	-

5.4. Utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance

Après la naissance la flore intestinale des animaux se développe. Des microorganismes proviennent de la mère et de l'environnement. Cette flore va se localiser dans les différentes portions du tube digestif en fonction de l'adéquation entre les besoins des espèces bactériennes et les conditions locales. Elle comporte à la fois une flore endogène dominante et sous-dominante fortement impliquée dans les phénomènes digestifs et une flore d'opportunité composée de bactéries saprophytes pouvant être pathogènes. Si cette flore se multiplie exagérément, cela peut provoquer des manifestations cliniques. Mais à l'inverse, si elles se développent à bas bruit, cela affecte les performances zootechniques des animaux. Ainsi les antibiotiques exercent leur action sur la flore endogène et d'opportunité. Par ce biais, les facteurs de croissance permettent de réduire les effets négatifs dus aux déséquilibres rencontrés lors de certaines périodes critiques de l'élevage ou dus à leurs conditions de vie insalubres. A faibles doses dans l'alimentation, ils permettent d'éviter ces déséquilibres en agissant sur les flores perturbatrices, généralement cataboliques. Par conséquent, les facteurs de croissance permettent une stimulation de l'anabolisme de l'animal. Les doses utilisées (de quelques mg à 50 mg/kg d'aliment) ne sont ni bactéricides ni bactériostatiques en regard de celles (quelques centaines de mg/kg) mises en œuvre dans les aliments médicamenteux, mais elles exercent un effet métabolique chez certaines espèces bactériennes qui se traduit par une modification des conditions de compétition au sein de ces flores complexes (*Corpet, 1999*).

Les avantages observés aux plans nutritionnel et environnemental sont :

- l'amélioration de l'indice de consommation (IC: quantité de matière sèche consommée pour produire 1kg de poids vif de l'animal) et de la vitesse de croissance (GMQ : gain moyen quotidien de poids vif).
- la réduction de l'excrétion de matières azotées, de phosphore et de méthane.

Sur le plan quantitatif, il y a des résultats variables en termes d'amélioration de l'IC et du GMQ, mais en moyenne ils sont tous nettement positifs (*Devie et al, 2006).*

La **figure 3** résume les mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques.

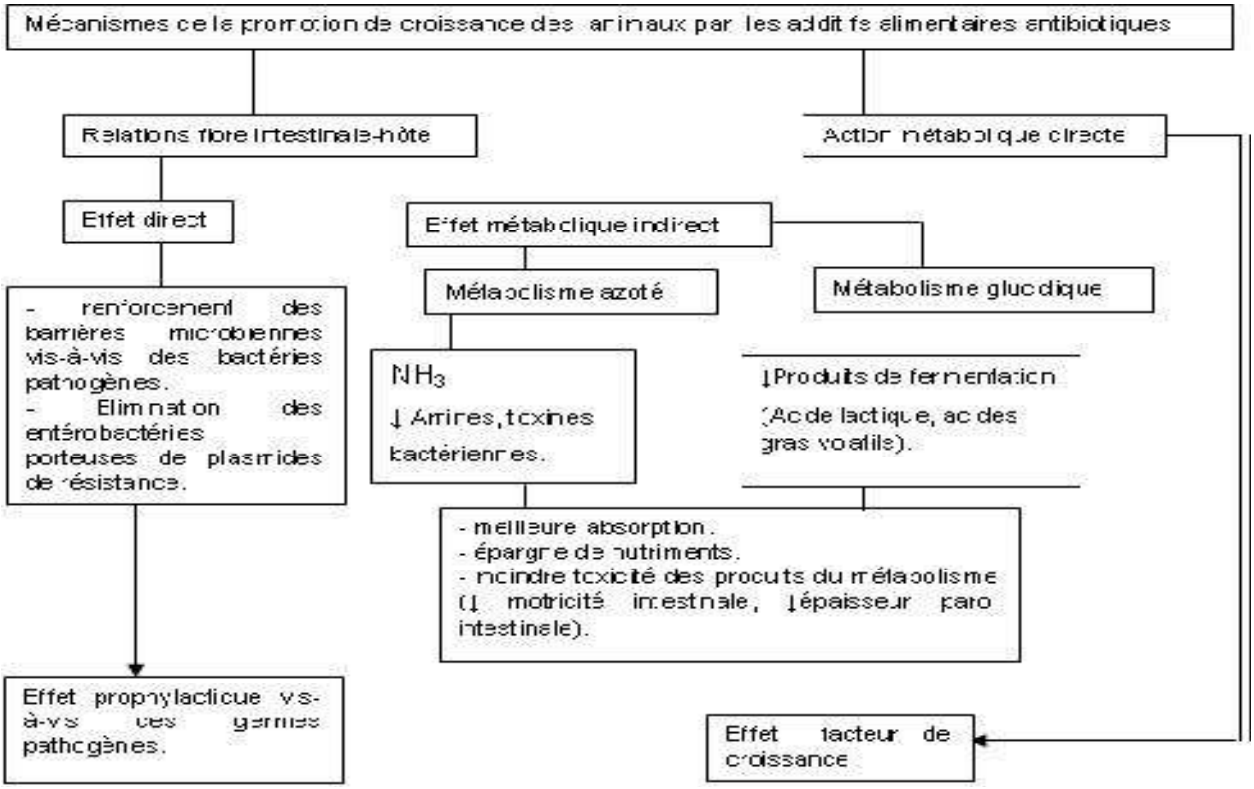


Figure 3 : Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques.

(*Fraysse et Darré, 1990*).

5.5. Association des antibiotiques

Les antibiotiques doivent autant que possible être utilisés seuls, c'est la règle générale de la mono-antibiothérapie. Toutefois on est souvent conduit en thérapeutique anti-infectieuse à associer plusieurs antibiotiques afin (*Cohen et Jaquot, 2001; Site 2, 2005* et *Guérin-Faublée, 2006*):

✓ de retarder l'apparition d'une antibiorésistance microbienne, mais uniquement chromosomique,

✓ d'assurer une couverture antibiotique en urgence (c'est-à-dire pour élargir le spectre d'activité) devant une infection à germes inconnus, lors d'infections poly-bactériennes ou lorsque l'on ignore la nature du germe en cause, c'est la principale raison en médecine vétérinaire,

✓ de rechercher une synergie,

✓ de limiter les effets indésirables, notamment la toxicité de certains antibiotiques en réduisant les doses de chacun.

5.6. Pharmacocinétique des antibiotiques

Pour éradiquer une infection, l'antibiotique doit parvenir à son site d'action, c'est-à dire atteindre les germes situés dans une structure donnée d'un organe, dans une cellule ou dans des liquides extra / péri-cellulaires, à des concentrations adéquates, et cela, pendant le temps nécessaire. Ce passage du lieu d'administration jusqu'au site (s) d'action se fait en quatre phases différentes (*Site 8, 2006*).

5.6.1. L'absorption

L'absorption d'une molécule, c'est-à-dire son passage du site d'administration à la circulation sanguine est fonction à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration, notamment de la voie (orale, parentérale) et de la formulation du médicament (*Guillemot, 2006*). Elle doit permettre le passage du médicament du site d'administration vers la circulation générale, pour que l'antibiotique puisse ensuite parvenir au site de l'infection. Certaines classes d'antibiotiques ont une bonne absorption digestive (macrolides, tétracyclines, sulfamides). Pour d'autres classes, l'absorption est nuls (aminosides, polypeptides), et la voie injectable est nécessaire pour obtenir un effet systémique. Enfin, dans certaines classes d'antibiotiques (béta-lactamines), certaines molécules sont bien absorbées, ce qui permet l'administration orale alors que d'autres devront être injectées (*Site 8, 2006*).

Pour les antibiotiques administrés par voie orale, il peut exister des interactions gênantes : ainsi, l'absorption des tétracyclines est très diminuée par l'ingestion concomitante de sels d'aluminium, de fer ou de calcium. L'absorption peut aussi être modifiée (en plus ou en moins) lorsqu'il existe chez un malade une pathologie du tube digestif (*Site 5, 2006; Site 8, 2006*).

5.6.2. La distribution

L'antibiotique parvient au site de l'infection plus ou moins bien : certains organes sont mieux irrigués que d'autres ; le site même de l'infection peut être mal irrigué (amas fibrinoleucocytaire de végétations valvulaires cardiaques, abcès entouré d'une coque). Les germes peuvent être situés dans le sang ou dans les espaces extracellulaires, ou à l'intérieur des cellules qui les ont phagocytés. Lorsque le passage de l'antibiotique du sang vers un site d'infection se fait par diffusion passive, Il se fera d'autant mieux que le gradient des concentrations (de la forme libre, seule diffusible) entre le plasma et les tissus sera important. Dans ce but, on peut même chercher un mode d'administration qui procure des concentrations

les plus élevés possibles (des pics), avec pour limite la toxicité propre éventuelle de l'antibiotique. La pénétration dans le système nerveux, l'œil et la prostate sont dépendants d'un transport actif. Si les bactéries se développent à l'intérieur des cellules, il faudra que les antibiotiques puissent y parvenir, sous une forme active ; un pH intra cellulaire plus ou moins acide ou basique modifie la vitesse de traversée des membranes des molécules, plus ou moins ionisées. Les quinolones, la rifampicine, l'isoniazide, l'association sulfaméthoxazole–triméthoprime pénètrent particulièrement bien.

L'administration d'une molécule à une dose et à un rythme donné peut donc être efficace sur une infection causée par un germe donné si elle est située dans un organe, et pas efficace si elle est située dans un autre. Le tube digestif, les méninges, la prostate, l'os ou les cavités urinaires par exemple posent des problèmes d'accès très différents (*Site 5, 2006*).

5.6.3. Les transformations

Comme tous les médicaments, les antibiotiques peuvent subir des transformations, en métabolites, actifs ou non sur les bactéries, toxiques ou non (c'est à dire induisant des effets indésirables). Les substances actives peuvent être métabolisées par différents organes. Si toutes les cellules de l'organisme possèdent une capacité métabolique de base, certains organes ont une capacité métabolique importante (foie, rein, poumon). La transformation d'une molécule par le métabolisme dépend de la structure de la molécule et des voies métaboliques exprimées chez l'animal.

Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs (sur le plan de l'activité antimicrobienne) tandis que d'autres sont peu métabolisées ou leur métabolisme conduit à des métabolites actifs (sur le plan microbiologique) (*Guillemot, 2006*).

5.6.4. Excrétion

Les concentrations dans un certain nombre de sécrétions de l'organisme (bile, urine, lait, salive, mucus pulmonaire, sécrétion intestinale, sueur, etc.) varient au cours du temps en fonction des modalités d'excrétion de la molécule et de ses métabolites (passive ou active). L'étude de la cinétique plasmatique d'une molécule après administration intraveineuse et la mesure des quantités émises sous forme de substance parentale et de métabolites, estimée sur la base des concentrations moyennes mesurées sur des quantités d'excrétas collectés au cours du temps, permet de mesurer la clairance totale et la part relative de la clairance métabolique et de la contribution des principaux organes d'élimination. La capacité d'élimination d'un principe actif, est exprimée par la clairance totale (ou clairance plasmatique) qui est la somme

des différentes clairances (clairance métabolique du foie, clairance d'excrétion biliaire, clairance d'excrétion rénale…).

Compte tenu de la complexité des étapes impliquées dans la pharmacocinétique d'un antibiotique, les concentrations mesurées à un instant chez différents animaux traités à la même dose, avec le même médicament, par la même voie d'administration, ont une variabilité importante qui s'accroît avec le temps (*Guillemot, 2006*).

6. LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ALIMENTS : RISQUE POUR LE CONSOMMATEUR

Au cours de leur vie, les animaux doivent parfois être traités avec des antibiotiques destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies infectieuses. 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, ovins, volailles et poissons. Néanmoins, ces résidus ne doivent pas être nocifs pour les consommateurs. Afin de garantir un niveau élevé de protection des consommateurs, la législation communautaire européenne subordonne l'autorisation d'utilisation d'une substance médicamenteuse chez des animaux producteurs d'aliments à l'évaluation de la toxicité des résidus potentiels. Lorsque cela s'avère nécessaire, des limites maximales de résidus (LMR) sont fixées et, dans certains cas, l'utilisation de la substance concernée est interdite (*Châtaigner et Stevens, 2005*).

6.1. Définition du résidu

Ce sont toutes les substances pharmaco-logiquement actives, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restant dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux aux quels le médicament vétérinaire en question a été administré, (Article 1, point 1, du règlement (CEE) n°2377/90), (*Milhaud et Pinault, 1999*; *Pouliquen et Le Bris, 2002*; *Kölbener et al, 2005*).

6.2. Facteurs de persistance des résidus

La persistance des résidus varie selon plusieurs facteurs (*Châtaigner et Stevens, 2005*):

- ✓ l'antibiotique lui-même,
- ✓ la forme pharmaceutique,
- ✓ les modalités d'injection,
- ✓ le site d'injection,
- ✓ la dose injectée,

- ✓ la sévérité de l'irritation locale,
- ✓ facteurs liés à l'animal.

6.3. Cause de la présence résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires

La présence des résidus d'antibiotiques est une conséquence des mauvaises pratiques des éleveurs et des vendeurs (*Scippo, 2008*):

- ✓ produits du marché noir,
- ✓ administration sans prescription vétérinaire,
- ✓ non respect des doses et des délais d'attente.

6.4. Risques engendrés par les résidus d'antibiotiques

La présence de résidus d'antibiotiques dans les produits alimentaires d'origine animale engendre:

- ✓ des risques pour la santé publique (*Scippo, 2008*),
- ✓ des risques pour la santé animale (*Scippo, 2008*),
- ✓ des risques pour l'environnement : contamination de l'environnement (excrétion des antibiotiques par les fèces, urines...), (*Scippo, 2008; Klotins, 2006*),
- ✓ et des risques d'ordre technologique (*Scippo, 2008*).

6.5. Risques pour la santé publique

6.5.1. Toxicité direct

Les antibiotiques dont l'utilisation est actuellement interdite et qui présentent plus de toxicité sont le chloramphénicol et nitrofuranes. Les nitrofuranes sont soupçonnés de foeto-toxicité. Les chloramphénicols, présentent un risque potentiel d'apparition d'effets secondaires tels que des formes idiosyncratiques d'anémie aplasique chez l'homme. (*Châtaigner et Stevens, 2005*).

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

On note aussi une action cancérigène de certains antibiotiques (cas des nitrofuranes, des nitroimidazoles où les produits de leur métabolisme sont cancérigènes). L'ingestion répétée et

prolongée de ces produits peut induire le développement de tumeurs cancéreuses, (*Châtaigner et Stevens, 2005*).

6.5.2. Réactions allergiques

On note des réactions allergiques chez des personnes déjà sensibilisées (risques très faibles si les LMR sont respectées). En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des bêta-lactames. Quand aux macrolides, ils causent peu d'effets secondaires causés par des mécanismes allergiques. Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus, comparés aux concentrations d'antibiotique administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu (*Châtaigner et Stevens, 2005*).

6.5.3. Acquisition des résistances aux antibiotiques

On appelle résistance, la capacité d'adaptation d'une bactérie dans un milieu contenant des agents chimiques néfastes pour elle et connue depuis longtemps. La résistance aux antibiotiques peut être définie selon différents points de vue (*Bourin et al, 1993*) :

- ✓ pour le clinicien, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace (on ne peut plus l'éradiquer par l'antibiothérapie) (*Bourin et al, 1993*),
- ✓ pour le pharmacologue, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action, sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice (*Guillemot, 2006*),
- ✓ pour le microbiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice (*Guillemot, 2006*),
- ✓ pour l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une concentration minimale inhibitrice significativement différente de celles de la population normale (*Guillemot, 2006*).

On distingue la résistance naturelle ou intrinsèque et la résistance acquise. La première est présente dans toutes les souches de l'espèce considérée et préexiste à l'usage des antibiotiques. Elle constitue une caractéristique propre à l'espèce et délimite le spectre d'activité des antibiotiques. En revanche, la résistance acquise n'est présente que chez quelques souches d'une espèce normalement sensible et apparaît à la suite de l'utilisation des antibiotiques (*Rod et al 2001; Klotins, 2006*).

Sur le plan génétique, deux mécanismes ont été identifiés (*Rod et al 2001*) :

✓ soit une mutation génétique survient sur le chromosome bactérien en présence répétée avec des antibiotiques ; dans ce cas, la résistance est transmise uniquement à la descendance (transmission verticale),

✓ soit la bactérie acquiert une information génétique provenant d'une autre bactérie déjà résistante via des plasmides ou des transposons ; dans ce cas, la résistance se transmet aussi d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) et d'une espèce à l'autre.

Toute utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire ou en médecine humaine accroît les risques d'apparition de bactéries résistantes. Les risques les plus grands sont associés à certaines pratiques d'administration des antibiotiques, comme celles qui consistent à administrer simultanément le produit à tout un troupeau, à administrer le produit de façon prolongée ou de sur utiliser un même antimicrobien.

Aucun lien direct n'a été établi entre l'usage d'antibiotiques comme stimulateurs de croissance dans les élevages et les anti-bio-résistances apparues chez les humains. Des chercheurs étudient cependant la possibilité qu'un tel lien puisse exister (*Klotins, 2006*).

6.5.4. Modification de la flore intestinale

Les résidus d'antibiotiques ont une influence potentielle sur la flore intestinale humaine en modifiant sa composition par inhibition sélective (*Scippo, 2008*). Des études in vivo sur des modèles animaux visant à évaluer les effets des doses thérapeutiques et des résidus de tétracycline 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 (*Châtaigner et Stevens, 2005*).

6.6. Risques pour la santé animale

Les antibiotiques utilisés en thérapeutique possèdent en règle générale une faible toxicité. Ceci les différencie des antiseptiques externes qui ne peuvent en aucun cas être employés par voie générale. Néanmoins, certains antibiotiques présentent une forte toxicité générale qui empêche leur emploi dans beaucoup d'espèces animales. C'est le cas des antibiotiques ionophores (monensin) qui présentent une toxicité cardiaque majeure.

En dehors des toxicités directes d'organe spécifique à chaque antibiotique, toute antibiothérapie doit faire craindre au praticien surtout deux types d'effets indésirables : une

perturbation de la flore digestive et des échecs thérapeutiques par sélection de résistance, (*Puyt et Guérin-Faublée, 2006*).

6.7. Risques d'ordre technologique

Selon *Scippo, 2008:*

✓ la présence d'antibiotiques dans le lait entraîne des accidents de fabrication du fromage, du yaourt et autres produits de fermentation du lait,

✓ la présence d'antibiotiques dans la viande entraîne des accidents de fabrication du salami et autres produits de fermentation de la viande.

6.8. Risques pour l'environnement

Il est aujourd'hui admis qu'après un traitement antibiotique, les animaux excrètent dans leur environnement une fraction de la dose administrée (présente notamment dans les fumiers ou les lisiers, ainsi que dans les poussières en suspension) avant d'être dégradée plus ou moins rapidement dans les fosses de rétention. En effet, on constate de fortes disparités dans le temps de demi-vie selon la molécule: la tylosine, par exemple, est dégradée beaucoup plus rapidement que l'oxytétracycline, détectable dans le fumier de veaux traités pendant 5 mois contre moins de 45 jours pour la tylosine. Ceci implique une persistance longue de certains antibiotiques dans l'environnement, ces derniers peuvent alors être présents dans les eaux de surface ou les rivières conduisant à une pollution chimique de l'environnement. Bien que les antibiotiques soient excrétés à des doses très inférieures à la Concentration Minimale Inhibitrice, ceci n'exclue pas leur action sur la flore microbienne (*Chatellet, 2007*).

La sélection de mutants résistants dans la flore intestinale des animaux traités, peut avoir des conséquences indirectes sur l'environnement: par la défécation, les animaux excrètent certains de ces mutants, qui peuvent alors, par les mécanismes génétiques de transfert de résistance déjà évoqués plus haut, transmettre leurs mécanismes d'échappement aux bactéries environnementales. Ces mutants peuvent accidentellement contaminer les denrées alimentaires: c'est ainsi qu'après l'utilisation, entre 1983 et 1990, de la streptothricine en ex-Allemagne de l'Est pour l'alimentation animale, les premières souches résistantes d'*E. Coli* apparues deux ans plus tard, ont transmis leur gène de résistance par l'intermédiaire d'un transposon, aboutissant à l'émergence de mutants résistants à l'antibiotique chez les porcs mais aussi chez les éleveurs et les membres de leur famille. Des souches résistantes d'*E. Coli* sont fréquemment retrouvées lors de l'analyse des eaux usées, et il est prouvé que ces dernières peuvent très bien y survivre, et échanger entre elles des plasmides porteurs de gènes

de résistance. Les eaux usées sont utilisées pour irriguer, et des bactéries résistantes ont été retrouvées sur des plantations 15 jours après qu'elles eurent été arrosées. De plus, un animal peut se contaminer en s'abreuvant aux eaux de surface. De la même façon, des bactéries d'origine fécale sont épandues avec le fumier, et par conjugaison peuvent transmettre leurs éventuels gènes de résistance aux bactéries du sol. L'utilisation des antibiotiques en élevage représente donc un risque de sélection de résistance chez les bactéries environnementales (*Chatellet, 2007*).

7. DELAI D'ATTENTE

7.1. Définition

Selon l'article L. 617-2 du CSP (Code de la Santé Publique) de la CEE (Communauté Economique Européenne), le délai temps d'attente est définit comme étant le temps à observer entre la dernière administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'obtention des denrées alimentaires provenant de cet animal, afin de garantir qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux limites maximales (LMR) établies par le règlement n° 90-2377 (CEE), pouvant présenter des dangers pour la santé du consommateur (*Milhaud, 1978, Milhaud et Pinault, 1999*).

Le délai d'attente ou période de retrait représente donc le temps nécessaire à l'excrétion complète d'un médicament après sa dernière prise (*Broes1 et al, 1999*). Les délais d'attente indiqués sur les notices qui accompagnent les produits sont valables pour les doses recommandées par le fabricant. Lorsque des doses supérieures sont prescrites par le vétérinaire, le délai d'attente doit être prolongé (*Broes1 et al, 1999*).

7.2. Fixation du délai d'attente

Pour fixer le temps d'attente d'une substance, il faut dans ce cas étudier son métabolisme pour connaitre les lieux d'accumulation et les voies d'excrétion du composé de départ et de ses métabolites et étudier leur décroissance en fonction du temps (leur cinétique). Ce ci nécessite une première investigation avec des molécules marquées, puis de nombreux travaux complémentaires pour identifier les métabolites et mettre au point des méthodes non radioactives pour les doser. Les différents temps d'attente proposés devront assurer qu'il n'y a pas de résidus mesurables (c.à.d. C<LMR) dans les productions de l'animal vivant (lait, œufs) ou dans les denrées alimentaires obtenues après l'abattage (*Milhaud, 1978*). Le délai d'attente de quelques antibiotiques chez différents animaux est résumé dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Délais d'attente fixés pour quelques antibiotiques utilisés en élevage *(Milhaud, 1978).*

Antibiotique	Animaux de boucherie	Animaux laitiers	Volailles pondeuses (Œufs)
Oxytétracycline	2 semaines	1 semaine	
Spiramycine	3 semaines	3 semaines	3 jours (Voie orale) 3 semaines (autres voies)
Oléandomycine	Voie orale 5 jours	5 jours	
Tylosine	3 semaines	3 semaines	2 semaines (formes injectables) 3 jours (Voie orale),
Polymyxine B	Voie orale (3 jours) Autres voies (1 mois)		

8. LIMITES MAXIMALES DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES (LMR)

8.1. Définition

Une LMR est la concentration maximale de résidus (exprimée en parties par million (ppm) ou parties par milliard (ppb)) qui peut demeurer dans les tissus ou les produits alimentaires (lait, viande, œufs…) issus d'un animal destiné à l'alimentation humaine à qui l'on a administré des médicaments vétérinaires et que les scientifiques et les autorités la 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 (*Pouliquen et Le Bris, 2002; Fabre et al, 2006*).

8.2. Fixation de la limite maximale d'un résidu (LMR)

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

La LMR toxicologique est définie pour assurer la sécurité du consommateur. Cette notion intègre tous les éléments liés à la toxicité de la molécule à court ou à long terme, quelle que soit la nature des effets observés sur l'individu ou sur sa descendance (*Fabre et al, 2006*).

La LMR bactériologique est une limite qui vise à garantir l'absence d'effet des résidus d'antibiotiques sur la flore digestive humaine. Elle est prise en compte indépendamment du fait que cette modification ait ou non un effet sur l'homme.

La LMR finale (officielle) prend la valeur la plus basse entre la LMR toxicologique et bactériologique (*Fabre et al, 2006*). La fixation de la LMR s'appuie aussi sur trois notions essentielles (*Fabre et al, 2006*):

✓ recherche de la Dose Sans Effet (DSE) sur l'animal par différents tests biologiques,

✓ à partir de cette DSE et des facteurs de sécurité (100 ou 1000), la Dose Journalière Admissible (DJA) est calculée: une consommation inférieure à 1 pour 100 ou pour mille de la concentration qui entraîne un effet.

✓ En partant de cette DJA, de la connaissance de la consommation alimentaire moyenne des habitants et de l'analyse de la répartition de la molécule dans les différents tissus et organes, on calcule les LMR (lait, viande…).

Conformément à la réglementation européenne concernant les LMR (limites maximales résiduelles) dans les différentes denrées alimentaires, les médicaments anti-infectieux utilisés en médecine vétérinaire sont classés le **tableau 8** (*Pinault, 1998; Puyt et Guérin-Faublée, 2006*).

Tableau 8: Limites maximales résiduelles (LMR) des antibiotiques exprimées en µg/kg ou ppb (*Pinault, 1998 ; Puyt et Guérin-Faublée, 2006*).

Substances avec LMR définitives							
Substances	**Espèces**	**Muscle**	**Foie**	**Rein**	**Graisse**	**Lait**	**Œufs**
Benzylpénicilline	Toutes	50	50	50	50	4	
Nafcilline	Bovins	300	300	300	300	30	
Ampicilline	Toutes	50	50	50	50	4	
Amoxicilline	Toutes	50	50	50	50	4	
Oxacilline	Toutes	300	300	300	300	30	
Cloxacilline	Toutes	300	300	300	300	30	
Dicloxacilline	Toutes	300	300	300	300	30	
Cefquinome	Bovins	50	100	200	50	20	
	porcs, équidés	50	100	200	50		
Ceftiofur	Bovins	1000	2000	6000	2000	100	
	porc	1000	2000	6000	2000		
Céfalexine	Bovins	200	200	1000	200	100	
Céfapirine	Bovins	50		100	50	60	
Céfalonium	Bovins					20	
Céfopérazone	Bovins					50	
Céfacétrile	Vache laitière					125	
Céfazoline	Bovins, ovins, caprins					50	
Stréptomycine	Bovins, Ovins	500	500	1000	500	200	
	Porcs	500	500	1000	500		

Tableau 8: *suite*

Substances avec LMR définitives							
Sustances	**Espèces**	**muscle**	**foie**	**Rein**	**graisse**	**laits**	**Oeufs**
Gentamycine	Bovin	50	200	750	50	100	
	Porcs	50	200	750	50		
Néomycine	Toutes	500	500	5000	500	500	500
Kanamycine	Toutes	100	600	2500	100	150	
Apramycine	Bovins	1000	1000	2000	1000		
Spectinomycine	Toutes sauf ovins	300	1000	5000	500	200	
	ovins	300	2000	5000	500		
Bacitracine	Bovins	150	150	150	150	100	
	Lapins	150	150	150	150		
Colistine	Toutes	150	150	200	150	50	300
Tétracycline	Toutes	100	300	600		100	200
Oxytétracycline	Toutes	100	300	600		100	200
Chlortétracycline	Toutes	100	300	600		100	200
Doxycycline	Bovins, porc, volaille	100	300	600	300		
Florfénicol	Bovins, ovins, caprins	200	3000	300	500		
	Porc	300	2000	500	200		
	Poulet	100	2500	750			
	poissons	1000			200		
	autres espèces	100	2000	300			

Tableau 8: *suite*

Substances avec LMR définitives							
Substances	**Espéces**	**muscle**	**foie**	**Rein**	**Graisse**	**laits**	**Oeufs**
Thiamphénicol	Bovins, poulet	50	50	50	50		
Erythromycine	Bovins	200	200	200	200	40	
	Ovins, Porc	200	200	200	200		
	Poulet	200	200	200	200		150
Spiramycine	Bovins	200	300	300	300	200	
	Porc	250	2000	1000			
	Poulet	200	400				
Tylosine	Bovins	100	100	100	100	50	
	Porc	100	100	100	100		
	Volaille	100	100	100	100		200
Tilmicosine	Bovins, Ovins	50	1000	1000	50	50	
	Porc, Lapin	50	1000	1000	50		
	Poulet	75	1000	250	75		
Tulathromycine	Bovins, Porcins		3000	3000	100		
Lincomycine	Toutes	100	500	1500	50	150	50
Tiamuline	Porc	100	500		100		1000
	Poulet	100	1000		100		
	Dinde	100	300				
Valnémuline	Porc	50	500	100			
Sulfamides	Toutes	100	100	100	100	100	
Baquiloprime	Bovins		300	150	10	30	
	Porc		50	50	40		
Triméthoprime	Bovins	50	50	50	50	50	

Tableau 8: *suite*

Substances avec LMR définitives							
Substances	**Espéces**	**muscle**	**foie**	**Rein**	**graisse**	**laits**	**Oeufs**
	Porc, Volailles	50	50	50	50		
	Poissons	50					
	Equins	100	100	100	100		
Acide oxolinique	Porc	100	150	150	50		
	Poulet	100	150	150	50		
	Poissons	100					
Fluméquine	Bovins	200	500	1500	300	50	
	Ovins, Porc	200	500	1500	300		
	Poulet, Dinde	400	800	1000	250		
	Salmonidés	600					
Enrofloxacine	Bovins	100	300	200	100	100	
	Ovins	100	300	200	100		
	Porc, Lapin, Volailles	100	300	200	100		
Sarafloxacine	Poulet		100		10		
	Salmonidés	30					
Danofloxacine	Bovins	200	400	400	100	30	
	Porc	100	200	200	50		
	Poulet	200	400	400	100		
Difloxacine	Bovins	400	1400	800	100		
	Porc	400	800	800	100		
	Poulet, Dinde	300	1900	600	400		
Marbofloxacine	Bovins	150	150	150	50	75	
	Porc	150	150	150	50		
Novobiocine	Bovins					50	
Rifaximine	Bovins					60	

Tableau 8: *suite*

Substances non soumises au LMR			
Substances	**Espèce**	**Tissu**	**Condition d'emploi**
Céfacétrile	Bovins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.
Céfalonium	Bovins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.
Céfazoline	Bovins, ovins, caprins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.
Céfomperazone	Bovins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.
Apramycine	Bovins, porc, lapin et poulet	Tout tissu sauf lait et œuf	Voie orale seulement, Interdiction d'emploi chez les femelles laitières et poules pondeuses.
Bacitracine	Bovins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.
Novobiocine	Bovins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.
Rifaximine	Toutes espèces animales Bovins	Tout tissu sauf lait	Voie intra mammaire seulement.

Substances avec LMR provisoires								
Substances	**Espèces**	**Muscle**	**Foie**	**Rein**	**Graisse**	**Lait**	**Œufs**	**Date**
Acide oxolinique	Bovins	100	150	150	50			01-01-2006

Substances avec LMR impossibles à fixer	
Substances	Chloramphénicol, nitrofuranes, nitro-imidazoles.

9. METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

Le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale s'effectue en deux étapes : la recherche d'un effet antibiotique par une méthode de dépistage microbiologique et la confirmation de la présence de l'antibiotique par une méthode physico-chimique (chromatographie liquide couplée à la détection UV, fluorimétrie ou la spectrométrie de masse) (*Guillemot, 2006*). *Selon Scippo, 2008*, le contrôle de ces résidus dans les denrées alimentaires est un processus complexe et coûteux. Mais il est indispensable pour garantir :

- la protection de la santé publique,
- le respect des règles qui régissent le commerce,
- la production de matières premières de qualité pour l'industrie agroalimentaire.

9.1 Les critères de choix d'une méthode

La méthode de recherche des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale reste une préoccupation majeure. Les critères permettant de faire un bon choix de la méthode est défini par *Richoubal et Cumont,* cités par *Denier, 1991*:

- ***La précision ("accuracy")*** : Elle est définie comme la différence entre la valeur mesurée par la méthode et la valeur vraie de la grandeur à mesurer. Elle est évaluée par:

- la fidélité : l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé à plusieurs reprises dans des conditions déterminées,
- la répétabilité : les résultats identiques obtenus par le même opérateur (même laboratoire, mêmes équipements) ;
- la reproductibilité : les résultats identiques obtenus dans des conditions différentes.
- la justesse: l'étroitesse de l'accord entre la vraie valeur et le résultat moyen obtenu en appliquant le procédé expérimental, un grand nombre de fois. Elle dépend de:
  - ✓ l'exactitude du calibrage ou de l'étalonnage (accord entre la droite observée et la droite théorique d'étalonnage);
  - ✓ La précision d'estimation qui est l'étroitesse de l'accord entre une méthode dite de référence et une méthode de routine sur un matériel identique.

- La sensibilité (" sensibility")

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

- La spécificité ("specificity")

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

- La détectabilité ou limite de détection

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

- Le taux de récupération

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

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

9.2. Choix de la méthode et objectifs

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

recherche de résidus d'antibiotiques a plusieurs objectifs dans le cadre de l'épidémio-surveillance (*Denier, 1991)*:

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

Chaque méthode a en plus un rôle propre:

- ***La Méthode de référence (****Denier, 1991)****:*** élaborée par un laboratoire de référence qui se charge de la mettre au point, puis de la diffuser. On peut tester la fiabilité d'une nouvelle méthode vis-à-vis de celle de référence.

- ***Les Méthodes de dépistage ou de présélection ("screening")*** (*Denier, 1991)****:*** Ce sont des méthodes rapides effectuées lors de contrôles intensifs ou urgents. Elles sont dites "multi résidus". Ces méthodes de screening doivent donner des résultats significatifs dans le cas de réponses négatives. Tout résultat positif exige, par contre, une confirmation ultérieure avec une méthode plus complexe et plus sélective. Ces méthodes ont l'avantage de restreindre le nombre d'échantillons qui exigent l'emploi de ces dernières techniques plus longues et plus coûteuses.

- ***Les Méthodes de routine (****Denier, 1991)****:*** ce sont des méthodes d'analyses rapides, simples, mais moins performantes que les méthodes de références officielles. On admet une certaine tolérance sur la précision.

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

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

9.3. Méthodes Biologiques (Microbiologiques) de dépistage des résidus d'antibiotiques

Les méthodes biologiques de dépistage des résidus des antibiotiques sont généralement rapides et peu coûteuses. Elles permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. Elles doivent avoir des limites de détection suffisamment basses (inférieures aux LMR ou aux niveaux minimum de performance requise). Comme toute méthode de dépistage, elles ne doivent engendrer qu'un faible nombre de faux négatifs (échantillons faussement

conformes) et un nombre limité de résultats faussement positifs pour rester attrayantes d'un point de vue économique. Les résultats positifs enregistrés en pratiquant ces méthodes de dépistage devant être nécessairement confirmés par des méthodes chromatographiques plus fiables (chromatographie en phase gazeuse ou HPLC couplées à la spectrométrie de masse (SM) (*Scippo et Maghuin-Rogister, 2006*).

9.3.1. Méthode prés sélection (Prémi® test)

Développé par DSM, le *Prémi® test*, permet de détecter les résidus d'antibiotiques présents dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, le poisson et les œufs. C'est un test à large spectre, il détecte un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande. Au bout de 4 heures, il donne un résultat fiable (*Eloit, 2004*).

- ***Principe***

Le *Prémi®test* est basé sur l'inhibition de la croissance de *Bacillus stearothermophilus*, bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques et aux sulfamides. Des spores standardisés sont inclus dans de la gélose additionnée de nutriments sélectionnés. Couvrant une large gamme d'antibiotiques, le *Prémi® test* est un test rapide, sensible, fiable donne un résultat fiable en moins de quatre heures, prêt à l'emploi et d'un bon rapport coût/performance. Il permet de déterminer rapidement le devenir de la viande (*Site 9, 2006*).

- ***Mode opératoire*** **(Figure.4)**

Le *Prémi®test* est d'une utilisation simple. Le jus de viande est déposé dans des tubes à essais contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacillus stearothermophilus*. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus et préchauffage de l'incubateur pendant 20 minutes, il faut incuber le tube pendant environ 3 heures à 64°C et vérifier la couleur **(Figure.4)** (*site 9, 2006*)

La lecture du résultat se limite à une comparaison de couleurs. En l'absence d'antibiotiques, les spores germent et se développent, entraînant l'acidification du milieu et un changement de sa couleur. Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que la quantité de composés antimicrobiens se situe au dessous des limites de détection du *Prémi®test*. Inversement, en présence d'antibiotiques, les spores ne se développent pas, elles sont inhibées par l'antibiotique; une couleur violette indique un

taux d'antibiotiques supérieur ou égal à la limite de détection du test **(Figure.4)** (*Site 9, 2006)*.

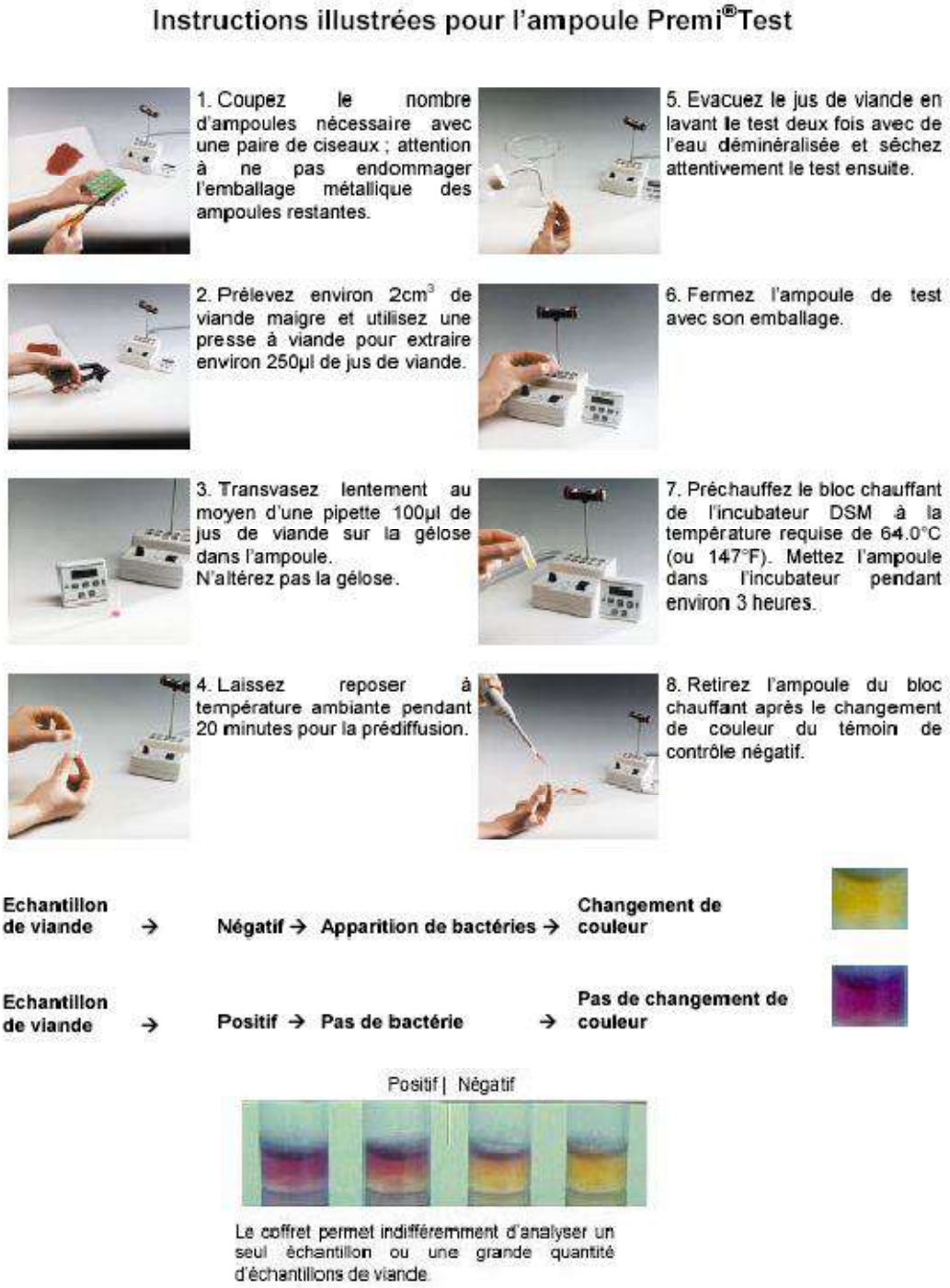


Figure 4: **Technique du premi®Test** ***(Bada Alembedji, 2008)***

9.3.2. Méthode de référence (méthode des quatre boites)

C'est la méthode officielle française de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande. Elle a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et de volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras (*Gaudin et al, 2006* ; *Scippo et Maghuin-Rogister, 2006*).

Principe

Elle est basée sur l'inhibition de la croissance de bactéries sensibles du genre *Micrococcus luteus, Bacillus substilis* et *Escherichia coli*. Les zones d'inhibition autour des points de dépôts des échantillons (morceau de rein ou papier filtre imbibé d'exsudat de cortex rénal) sont révélatrices de la présence potentielle d'antibiotiques (*Scippo et Maghuin-Rogister, 2006*; *Berthe et al*, 2007).

Mode opératoire

Cette méthode requiert l'utilisation des espèces suivantes : *Bacillus subtilis* cultivée à trois pH différents (6, 7,4 et 8), *Micrococcus luteus* cultivé à pH8 et *Escherichia coli* cultivé à pH8. Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Bacillus subtilis* à pH 7,4, l'addition de Triméthoprime permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie Triméthoprime-sulfamides. Les principales étapes de cette méthode sont les suivants (*Gaudin et al, 2006*):

-sortir les échantillons du congélateur, quelques minutes avant d'opérer, et les déposer sur un plateau en acier inoxydable,

-prélever sur chaque échantillon une carotte cylindrique de 8 mm de diamètre et de 2 cm de long environ, à l'aide d'un emporte-pièce,

-tout en poussant le cylindre de muscle hors de l'emporte-pièce, découpé à l'aide d'un bistouri huit rondelles de viande de 2 mm d'épaisseur,

-placer deux rondelles en positions diamétralement opposées sur chacune des quatre boîtes d'essai, en utilisant des pinces. Il est ainsi possible de déposer dans chacune de ces boîtes jusqu'à six rondelles, correspondant à trois échantillons à examiner, toutes ces rondelles devant se situer sur un cercle à environ 1 cm de la périphérie de la boîte.

-pour chacune des quatre boîtes :

- sont considérés comme positifs, les échantillons de viande donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins égale à 2 mm. Il faut recommencer l'essai

chaque fois que le résultat semble douteux (pour un même échantillon une rondelle étant positive et l'autre négative, colonies éparses dans la zone d'inhibition, contaminations, etc.). Si le second résultat n'est pas considéré comme positif, le résultat douteux doit être considéré.

- sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique, les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des quatre boites. De plus chaque boite présente une sensibilité particulière pour certaines familles d'antibiotiques, ce qui permet de donner les orientations résumés dans **le tableau 9** (*Gaudin et al, 2006*).

Tableau 9: Correspondance souches et milieux avec les familles dépistées.

Souche	***B. subtilis***	***B. subtilis***	***B. subtilis***	***M. luteus***
pH	6	7,4	8	8
milieu	Test agar	Test agar + Triméthoprime	Test agar	Test agar
Molécules cibles	Béta-lactamines ou Tétracyclines	Sulfamides.	Aminosides	Béta-lactamines et Macrolides

Les souches utilisées sont connues pour leurs sensibilités à certaines familles d'antibiotiques aux pH indiqués **(Tableau 9)**. Les milieux sont inoculés par une charge bien déterminée en souches. Une préparation préalable des suspensions des souches utilisées est donc nécessaire avant de passer à la technique proprement dite.

9.3.3. 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 poisson ***(****Gaudin. V, Fabre. J.M, Rault. A)*.

Les microorganismes test suivants sont utilisés ***(****Gaudin. V, Fabre. J.M, Rault. A)*:

✓ **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 pH7.4 pour les Sulfamides et bétalactamines.

9.3.4 Test rénal belge

Test rénal, officiel en Belgique comme test de dépistage des résidus d'antibiotiques, (Amélioration réalisée sur la méthode de référencée) a pour avantage d'être plus simple et moins coûteux que d'autres tests microbiologiques d'inhibition comme la méthode des 4 plaques (boites) (*Koenen-Dierick et al.,* 1995).

Après validation, selon des normes généralement admises au niveau international, la méthodologie a été appliquée en pratique sur des échantillons réels collectés en abattoirs par les inspecteurs de l'Institut d'Expertise vétérinaire (IEV), échantillons qui avaient fait l'objet d'un premier contrôle positif pour la présence d'antibactériens au moyen du test officiel belge (nouveau test rénal, Arrêté ministériel du 19 juin 1995).

Actuellement, ce test est appliqué comme une méthode de premier dépistage *(pre-screening*) sur les reins des animaux abattus pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif. Il permet uniquement de détecter la présence de substances inhibitrices dans le rein et l'exsudat rénal, mais il ne permet pas d'identifier la substance concernée dans les parties consommables de la carcasse et en particulier dans la viande.

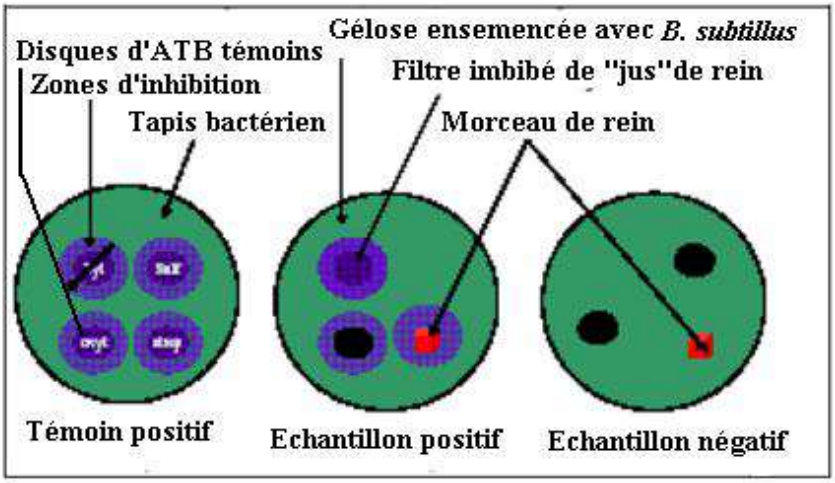


Figure 5: Test rénal (*Scippo, 2008*)**.**

9.4. 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 (*Caude. M et Jardy. A I*)**.** La phase stationnaire peut être disposée *(Caude. M et Jardy. A II)* 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 *(Caude. M et Jardy. A II)***:**

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

9.4.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Figure.6)

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 *(Caude. M et Jardy. A I)*

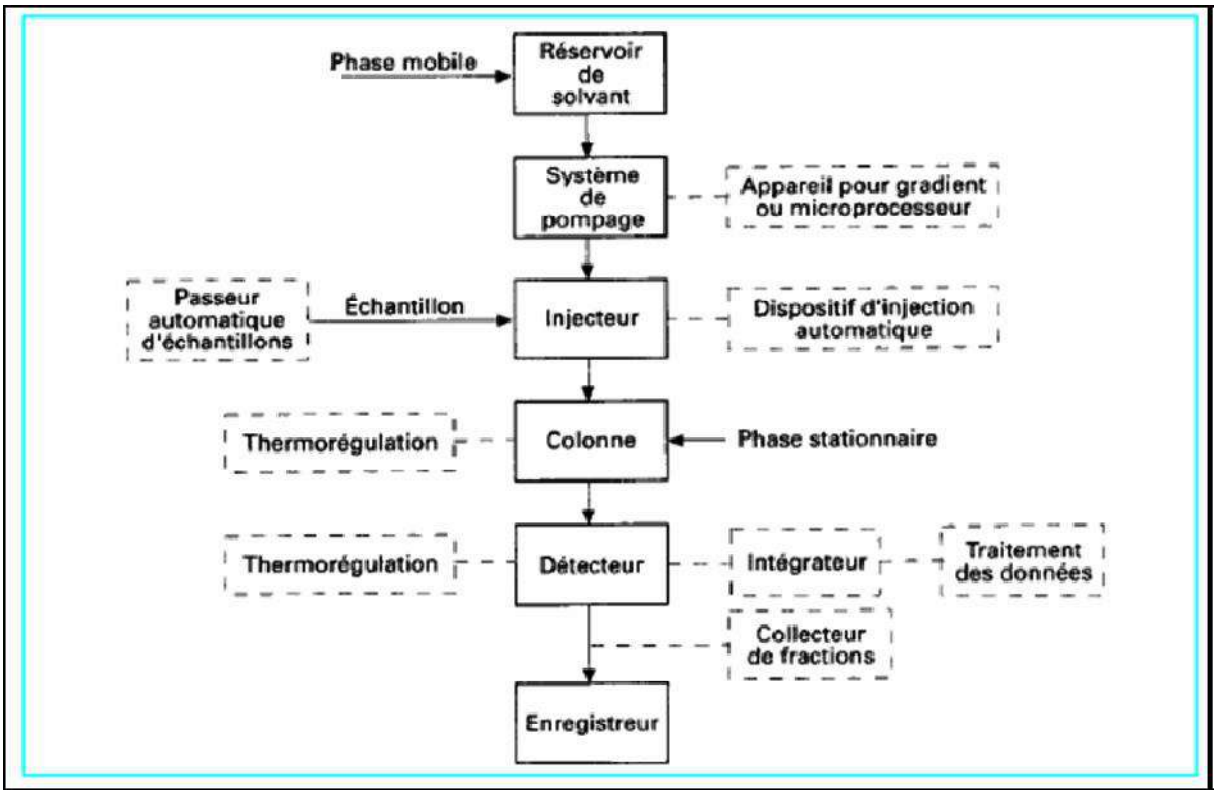


Figure 6: **Schéma du principe d'un chromatographe en phase liquide.**

(Caude. M et Jardy. A II)

L'utilisation des étalons de concentrations connus permet d'identifier et de quantifier les composants d'un échantillon *(Caude. M et Jardy. A III)*:

✓ L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétentions obtenus pour l'échantillon et pour les étalons. Le temps de rétention TR 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*** 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. ***Lee. J-B* et al** ont ciblé les molécules suivantes dans divers matrices: ampicilline, les tétracyclines (Chlorotétracycline, oxytétracycline, tétracycline), les macrolides (Tyrosine, érythromycine, spiromycine), Chloramphénicol et hygromycine.

Le traitement des échantillons passe par une phase d'extraction dont le protocole diffère d'une famille à une autre (*Lee. J-B et al, 2007*)

L'HPLC peut être couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM-SM) pour détecter et quantifier les résidus d'antibiotiques dans divers matrices *(Gaudin. V et al ; Krebber. R et al; Kunihiro Kishida, 2007)*.

9.4.2. Chromatographie sur couche mince CCM (Figure.7)

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 *(Siouffi. A.M et al)*.

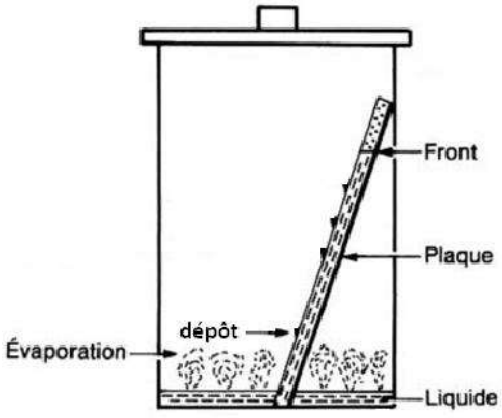


Figure 7: **Dispositif de la chromatographie sur couche mince.** *(Siouffi. A.M et al).*

1. Lieu de travail

Notre travail a été réalisé au niveau des différents laboratoires (Stérilité, microbiologie) du complexe ANTIBIOTICAL/ SAIDAL de Médéa durant une période de 3mois. Une partie complémentaire a été réalisée au niveau du Hall technologique (université Yahia Farés de Médéa), au niveau du laboratoire de microbiologie (Direction de la Santé Publique de Médéa) et aussi au niveau du laboratoire de bactériologie (hôpital de ksar el boukhari).

2. Matériels

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Echantillons

Les échantillons de viande (rouge et blanche) et de foie de poulet au nombre de 95 provenant de différentes régions du centre : Médéa (Médéa, ksar el boukhari, Berrouaguia, Sidi naamane, Béni Slimane, Saghouane, Tablate, Ben chikao, El Omaria), Djelfa (Birine, Djouaber), Alger, Boufarik, Cherchel, Tipaza, ont été prélevés dans différents abattoirs et points de vente de la wilaya de Médéa. 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 préconisée *(Site 12)*.

Parmi les 95 échantillons prélevés, nous avons 30 échantillons de Bovins, 13 échantillons d'ovin, 1 échantillon de caprin ,31 bréchets et 20 foies. Parmi les 44 échantillons de viandes rouges, 21 échantillons sont issus d'abattages normaux, 3 échantillons issus d'abattage de réforme, 1 échantillon issu d'abattage d'urgence et 19 échantillons issus d'abattages inconnus.

En parallèle, des échantillons Témoins négatifs ont été préparés en faisant des élevages de poulets à domicile sans antibiotique.

2.1.2. Souches bactériennes

Plusieurs souches de collection ont été utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques par la méthode de référence :

- 2 souches de *Bacillus subtilis* (Réf : ATCC 6633) issues de deux origines différente.
- 2 souches de *Micrococcus luteus* (Réf : ATCC 9341), issues de deux origines différente.
- *Escherichia coli* (Réf : ATCC 8739).

D'autres souches ont été aussi utilisées pour la mise au point des méthodes alternatives :

- ❖ *Bacillus stearothermophilus* (Réf : ATCC 7953).
- ❖ *Staphylococcus aureus* (Réf : 6538P).

2.2. Produits et milieux

✓ Milieux :

- Soja agar,
- Test Agar pH6, pH7.4, pH8,
- Mueller et Hinton,
- Chapman,
- Mannitol mobilité,
- Gélose nutritive.

La composition ainsi que la préparation de ces milieux sont détaillées en **annexe I**.

✓ Produits chimiques et réactifs :

- Solutions Standards des antibiotiques : Pénicilline G, Ampicilline, Chlorotétracycline, Oxacilline, Amoxicilline, Erythromycine, Sulfathiazol, Enrofloxacine, Streptomycine, Gentamycine et Triméthoprime. La composition, la préparation ainsi que l'usage de ces solutions sont détaillés en **annexe II**.
- Solution d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%),
- Des indicateurs colorés (pourpre de bromocrésol, bleu de bromothymol, rouge de phénol).
- L'huile de vaseline.

2.3. 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 à volume fixe (1000µl),
- Micropipettes à volume variable (10µl, 25µl),

- Ecouvillons.

2.4. Grand matériel

- Réfrigérateurs et Congélateurs,
- Bain marie,
- Balance de précision,
- Four pasteur,
- Étuve,
- Autoclave,
- Plaques d'agitation,
- Incubateurs du Prémi®Test avec ses annexes (presse viande, ciseau, thermomètre, pipettes en plastique avec embouts),
- Hautes microbiologiques.

3. Méthodes

3.1. Sondage sur terrain

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.

Ce sondage nous permet d'avoir une idée si les éleveurs algériens respectent la norme d'utilisation des antibiotiques au niveau de l'élevage et de cibler les familles d'antibiotiques à rechercher au niveau du laboratoire.

3.2. Analyses microbiologiques au laboratoire par les méthodes officielles

Deux méthodes microbiologiques officielle ont été utilisées pour analyse nos échantillons: une Méthodes de dépistage ou de présélection ("screening") (*Prémi®test*) et une méthode de référence (*Méthode des quatre boites*) associée à la *méthode STAR*.

3.2.1. Présélection par Prémi®Test

Les échantillons de viandes (rouge et blanche) et de foie ont été testés par la méthode du Prémi®Test. La technique se résume ainsi:

- ✓ Découper le nombre d'ampoules nécessaire sans abîmer le film d'aluminium qui protège les ampoules voisine. Retirer les du réfrigérateur. Laisser les à température ambiante,
- ✓ Enlever prudemment le film de protection recouvrant le nombre d'ampoules souhaité (ne pas ouvrir plus d'ampoule que nécessaire),
- ✓ Découper environ 2cm^3 de viande maigre et utiliser la presse viande pour extraire les jus. Il est également possible d'obtenir du jus de viande en faisant congeler/décongeler l'échantillon,
- ✓ Les jus de foie sont dilués au ½. Les jus de viandes sont utilisés à l'état concentré selon la méthode officielle de DSM,
- ✓ 100µl de jus (concentré ou dilué) sont déposés sur la gélose sans la toucher. Laisser 20min à une température ambiante pour une pré-incubation,
- ✓ Eliminer le jus en rinçant deux fois le contenu des ampoules par l'eau distillée. Il est important d'éliminer soigneusement le restant d'eau de l'ampoule,
- ✓ Recouvrir les ampoules de test par le film fourni pour éviter l'évaporation, puis incuber (à l'incubateur) à 64°C pendant trois heures,
- ✓ Il est conseillé de faire parallèlement un témoin négatif. Lire les résultats du test lorsque le témoin négatif aura changé de couleur,
- ✓ Observer après incubation:
  - Si la couleur du milieu a viré du violet au jaune, l'échantillon est jugé négatif,
  - Si la couleur n'a pas changé, l'échantillon est jugé positif.

3.2.2. Confirmation par la méthode de référence associée à la méthode STAR

Pour la confirmation de la présence des résidus d'antibiotiques au niveau de nos échantillons, nous avons utilisé la méthode de référence (méthode des quatre boites). Afin de compléter notre étude en dépistant le maximum de molécules, nous avons ajouté une boite de la méthode STAR pour détecter les quinolones. Une préparation préalable des suspensions des souches utilisées est nécessaire avant de passer à la technique proprement dite.

a- Réactivation des souches

Nous avons effectué la réactivation des souches (*Bacillus subtilis* ,*Micrococcus luteus, Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Bacillus stearothermophilus)* prélevées à partir de la culture stockée sur gélose inclinée. Ce repiquage nous a permis d'obtenir des souches jeunes.

Mode opératoire **(Figure.8)**

- 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.
- Incuber à une température de 30 à 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).
- Incuber à 30°C-37°C pendant 24h à 48h.
- Introduire 75 ml d'eau physiologique stérile dans la bouteille de Roux et récupérer la souche en raclant avec des billes en verres stériles.
- Récupérer la suspension riche en souche dans une fiole de 100ml stérile qui constitue la solution mère.

b- Dénombrement (Figure.9)

- Préparer 10 tubes de 9ml d'eau physiologique stérile à 0,9%,
- Procéder à la dilution de 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 $2^{ème}$ tube, puis du $2^{ème}$ vers le $3^{ème}$ tube et ainsi de suite jusqu'au la dernière dilution 10^{-10},
- Introduire dans chaque boite de Pétri 0.1 ml de chaque dilution (de la 10^{-1} jusqu'à 10^{-10}), Utiliser 2 boites de Pétri pour chaque dilution,
- Introduire 15 à 20ml du milieu soja agar 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 des colonies : Après incubation, sélectionner les boites présentant un nombre de colonie compris entre 30-300 UFC (les colonies sont dénombrées en surface des boites de Pétri).
- Prendre la moyenne arithmétique des dénombrements entre les deux essais pratiqués avec la même dilution.

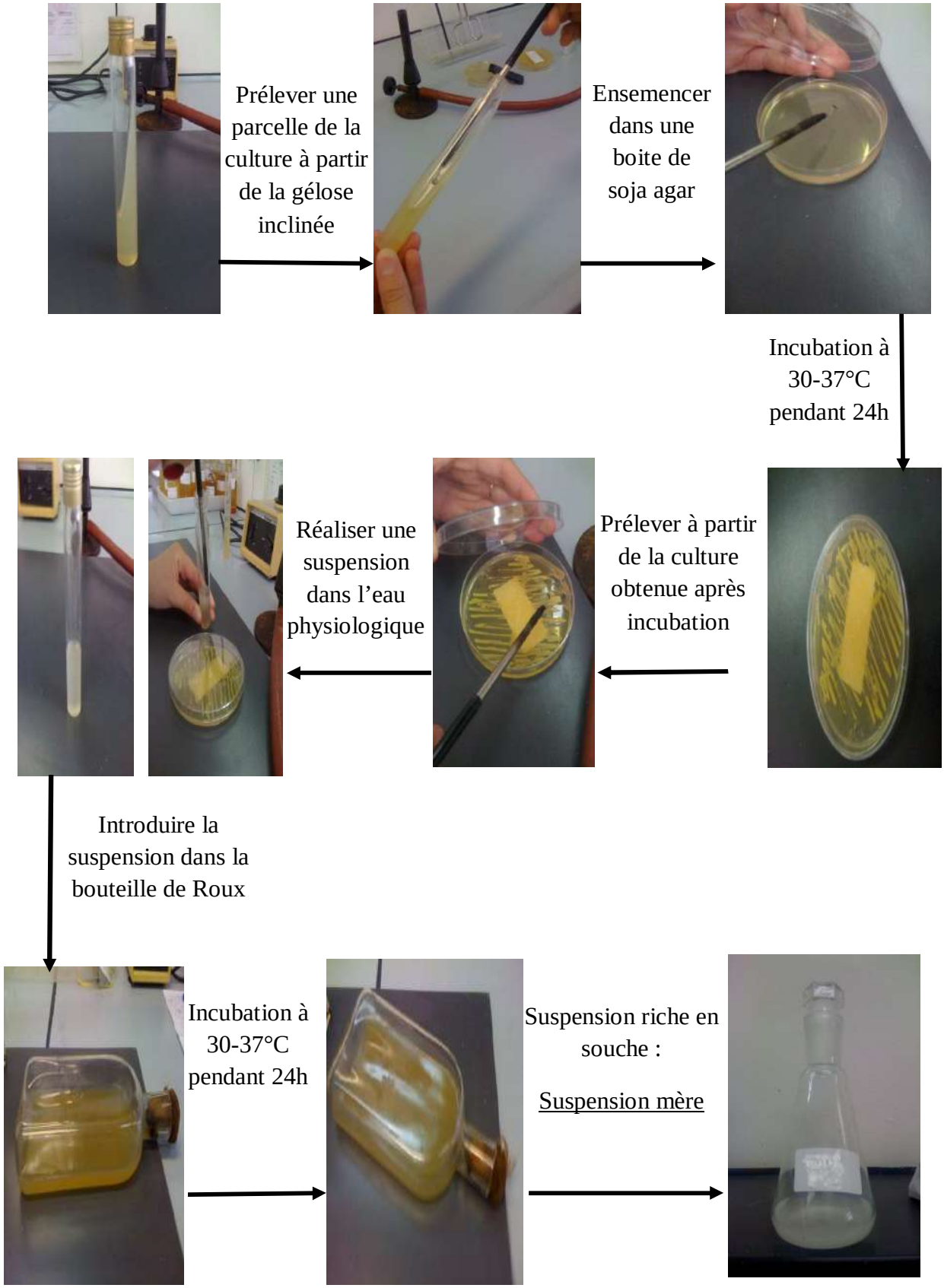


Figure 8 : Protocole de réactivation des souches

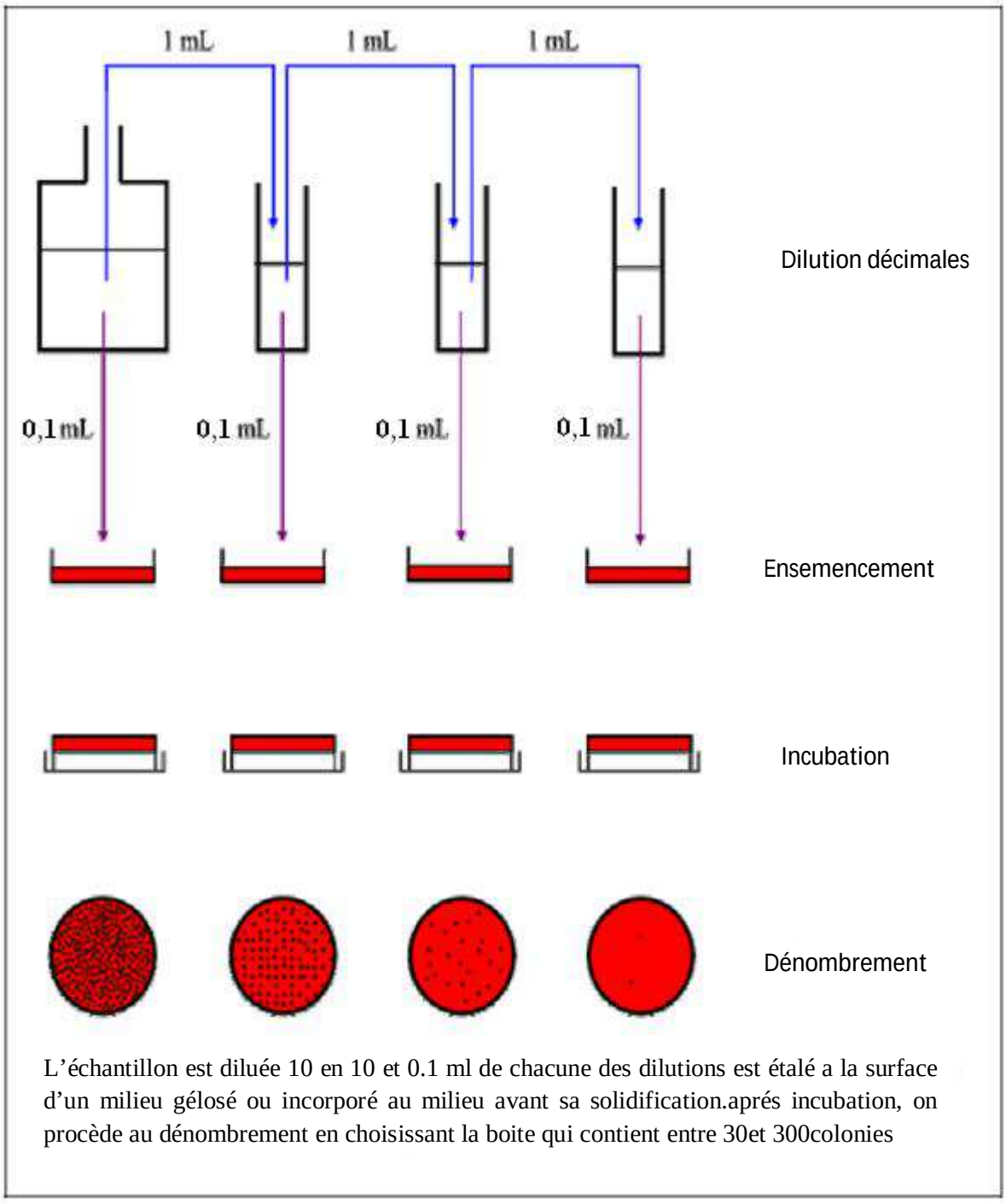


Figure 9: Procédé générale du dénombrement.

- 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.

c- Détermination de la suspension qui servira d'inoculum

Pour *les trois souches*: une fois la charge de la suspension mère est déterminée, il suffit de calculer la dilution à réaliser afin d'obtenir une suspension fille dont la charge est située entre 10^4 et 10^5/ml (puisque la méthode d'ensemencement choisie est par écouvillonnage en nappe).

d- Contrôle de la sensibilité des souches

Afin de s'assurer que les souches utilisées dans ce test microbiologique sont suffisamment sensibles pour détecter les résidus d'antibiotiques au niveau de nos échantillons, un antibiogramme a été exercé en milieu « Soja Agar ». La méthode se résume ainsi:

- Préparer des solutions d'antibiotique à différentes concentrations (Ampicilline 0,2 mg/ml, Tétracycline 0,6 mg/ml, Streptomycine 10 mg/ml, Pénicilline G 0,12 mg/ml, Enrofloxacine 0,1mg/ml, Sulfamide (Sulfathiazol) 4 mg/ml, Erythromycine 0,3 mg/ml, Amoxicilline 0,5 mg/ml, Oxacilline 0,1 mg/ml, Gentamycine 0.3 mg/ml),
- Couler le milieu « soja agar » dans les boites de Pétri et laisser se solidifier,
- A l'aide d'écouvillons, réaliser un ensemencement en nappe des souches.
- Poser des disques vierges à la surface du milieu ensemencé,
- Imbiber chaque disque par 50µl de chaque solution antibiotique, de telle sorte que la charge des disques sera conforme à la méthode officielle (**Tableau 10**).
- Incuber les boites à 30-37°C pendant 24h.
- Lecture des boites : mesurer les diamètres des zones d'inhibition obtenues pour chaque antibiotique.
- Comparer les diamètres obtenus avec ceux d'un tableau de référence permettant de juger la sensibilité de la souche testée (**Tableau 10**). Ce dernier est établi par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (SFM).

Tableau 10 : 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	6µg	≥29	<29
Ampicilline	10µg	≥21	<21
Chlorotétracycline	30µg	≥19	<17
Oxacilline	5µg	≥20	<20
Amoxicilline	25µg	≥21	<14
Erythromycine	15µg	≥22	<17
Sulfamides	200µg	≥17	<12
Enrofloxacine	5µg	≥22	<17
Streptomycine	500µg	≥15	<13
Gentamycine	15µg	≥18	<16

e- Protocole opératoire proprement dit

La méthode est résumée sur le **tableau 11**. La composition ainsi que la préparation des milieux utilisés sont détaillées en **annexe I**.

Tableau 11: Correspondance souches et milieux avec les familles dépistées.

Souche	*B. subtilis*	*B. subtilis*	*B. subtilis*	*M. luteus*	*E. coli*
Milieu	Test agar pH 6	Test agar pH 7.4 + Triméthoprime	Test agar pH 8	Test agar pH 8	Test agar pH 8
Famille Dépistée	Béta-lactamines ou Tétracyclines	Sulfamides.	Aminosides	Béta-lactamines et Macrolides	Quinolones

Les souches utilisées sont connues pour leurs sensibilités à certaines familles d'antibiotiques aux pH indiqués **(Tableau 11)**.

La technique proprement dite se résume ainsi (**Figure.10**):

- A l'aide d'écouvillons, ensemencer la surface de chaque milieu par une suspension (10^4 à 10^5 UFC/ml) de chaque souche,
- 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.
- En parallèle, réaliser un témoin pour chaque boite: placer un disque en papier vierge de 9 mm de diamètre. Imbiber le disque par 10µl de la solution témoin. Les solutions témoins utilisées sont : Pénicilline G à 0,2 UI/ml, Sulfathiazol à 4 µg /ml, Dihydrostreptomycine à 5 µg/ml, Erythromycine à 0,25 µg/ml et Enrofloxacine à 0,8 µg/ml.
- Incuber les boites (*B. subtilis*, *M. luteus* et *E. coli)* à 30-37°C pendant 24h.
- Lecture : observer et mesurer les zones annulaires d'inhibition.

3.3. Mise au point de méthodes alternatives

Dans le but de mettre au point des méthodes alternatives moins couteuses, les échantillons ont été aussi testés en utilisant des méthodes de dépistage en boites, faisant intervenir des souches sensibles aux antibiotiques, de préférence différentes de celle utilisées par la méthode de référence. Le Principe se résume au dépistage des résidus d'antibiotique en utilisant une seule boite d'un milieu approprié ensemencé par une seule souche multi-sensible.

En fin, un test « en tube » a aussi été initié sur un échantillon positif ayant donné les plus grandes zones d'inhibition au cours du dépistage par la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR.

3.3.1. Réactivation des souches

Nous avons utilisé dans cette partie trois souches : *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*. Le protocole de réactivation est identique à celui déjà détaillé auparavant (section 3.2.2 sous titre-a). Il faut signaler qu'à la différence des deux autres souches, *Bacillus stearothermophilus* n'a pas été réactivé à partir d'une collection mais il a été isolé à partir d'ampoules destinées au contrôle de la qualité d'autoclavage. *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* sont incubés à (30-37°C) et *Bacillus stearothermophilus* est incubé à 60°C.

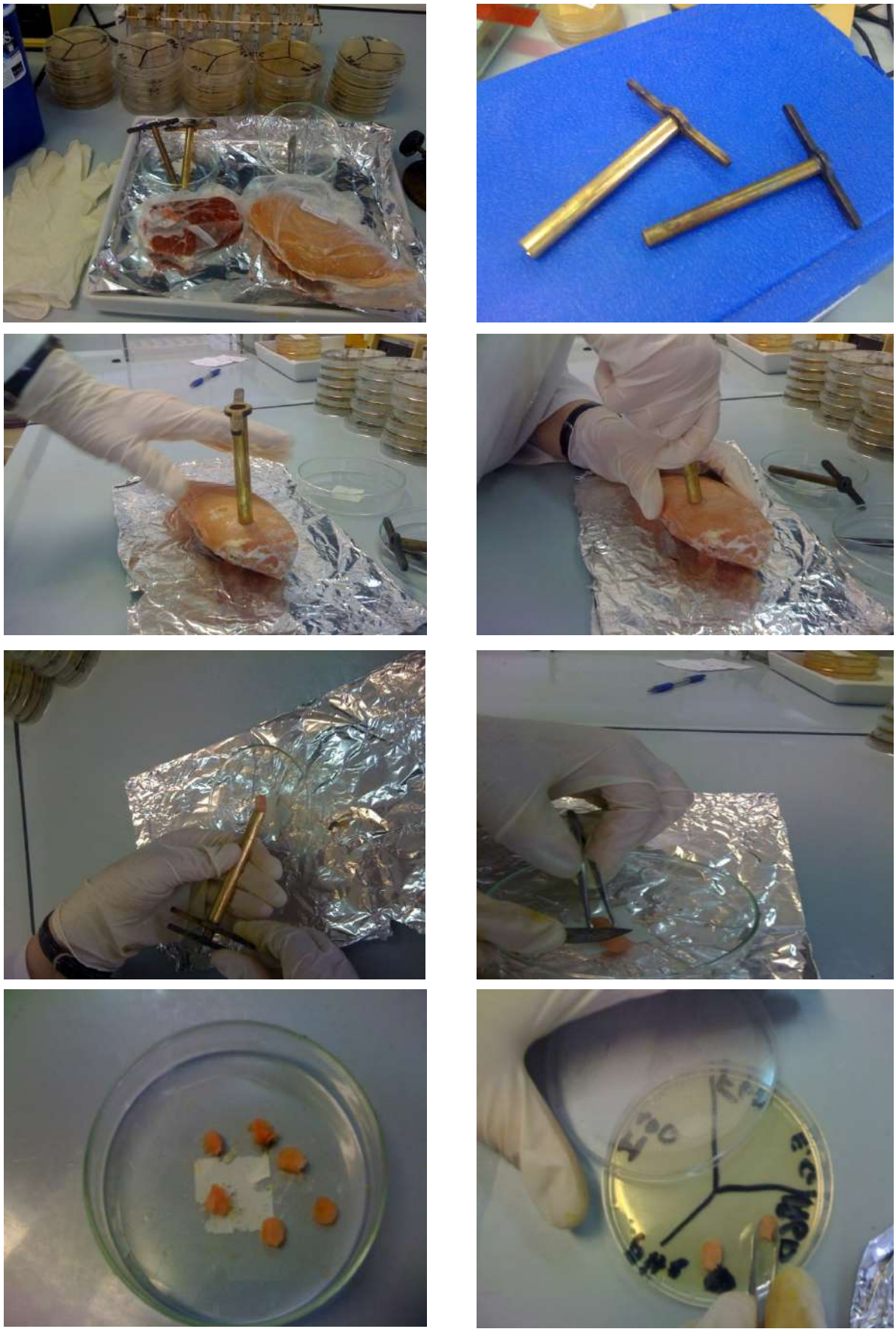


Figure 10: Technique de la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR.

3.3.2. Dénombrement

Les suspensions mères des souches utilisées obtenues après réactivation ont été dénombrées selon le protocole déjà détaillé auparavant (section 3.2.2 sous titre-b).

3.3.3. Test de la sensibilité des souches choisie

Le but de cette partie est la recherche de souches multi-sensibles afin de pouvoir l'utiliser comme moyen de dépistage des antibiotiques au niveau des viandes. En plus de *Micrococcus luteus* déjà testé pour sa sensibilité, nous avons réalisé les antibiogrammes correspondant aux deux autres souches : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus stearothermophilus.* La technique ainsi que la lecture de l'antibiogramme sont réalisées selon la même procédure déjà détaillée auparavant (section 3.2.2 sous titre-d).

3.3.4. Méthode en une seule boite

Trois milieux ont été utilisés : le milieu Soja Agar, Mueller/Hinton et Chapman. Notre but est de sélectionner le milieu qui donne une meilleure diffusion des antibiotiques issus de l'échantillon à analyser et aussi de sélectionner la souche la plus détectrice des résidus d'antibiotique. Pour cela notre travail est subdivisé en deux parties :

a-Choix du milieu

Dans cette partie, nous avons choisi les deux souches les moins sensibles (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus stearothermophilus*) afin de tester la présence des résidus d'antibiotiques au niveau des échantillons positifs en utilisant trois milieux : Soja Agar, Mueller/Hinton et Chapman. Il faut signaler que le milieu Chapman est utilisé uniquement pour *Staphylococcus aureus*. La technique se résume ainsi:

- A l'aide d'écouvillons, ensemencer la surface de chaque milieu par une suspension (10^4 à 10^5 UFC/ml) de chaque souche.
- 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 (*B. stearothermophilus* à 60°C et *S. aureus* à 30-37°C) pendant 24h.
- Lecture : observer et mesurer les zones annulaires d'inhibition.

b-Choix de la souche

Une fois le milieu est choisi, nous procédons à la sélection de la souche adéquate. Cette dernière permet de détecter la présence des résidus d'antibiotiques sur les viandes à des teneures supérieur à la LMR. Une souche adéquate n'est pas forcément la souche la plus sensible car cette dernière peut détecter la présence des résidus d'antibiotiques à des teneures inférieures à la LMR (en donnant de faux positifs). Pour cela nous avons comparé les zones d'inhibitions obtenues avec les trois souches en utilisant le milieu choisi. Il ne faut pas oublier la nécessité de tester les échantillons négatifs et les douteux afin d'exclure la présence des faux positifs.

3.3.5. Méthode en tubes

a-Principe

Il s'agit d'un test miniaturisé en tube qui consiste à mélanger une 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 teneure 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 résidu 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.

b-Méthode en tubes sur milieu Mueller et Hinton :

Dans cette méthode, nous avons utilisé le milieu Mueller et Hinton, milieu solide favorable pour une bonne diffusion des antibiotiques. Ce milieu a été choisi dans la méthode sur boite. La souche choisie est *M. luteus* (la souche la plus sensible).

Choix de l'indicateur colorés et Optimisation de l'inoculum bactérien:

En chimie, un indicateur coloré est un couple de deux espèces chimiques dont l'une de ces espèces prédomine par rapport aux autres en solution, et ce en fonction des propriétés du milieu. En fonction de l'espèce qui prédomine, la couleur de la solution est différente. Plusieurs types de molécules peuvent être appelées indicateurs colorés:

- les indicateurs colorés de pH sont les plus connus et sont souvent sous-entendu lorsque l'on parle d'indicateur coloré ;

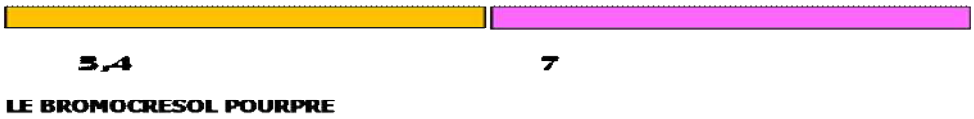
- les indicateurs colorés redox (ou de potentiel électrochimique) ;
- les indicateurs colorés de complexométrie,
- les indicateurs colorés de précipitation.

La propriété de changer de couleur en fonction de l'acidité de leur milieu environnant donne aux indicateurs colorés une utilité dans certaines sciences expérimentales telles que la chimie, la biologie, la médecine et la microbiologie. Parmi les indicateurs colorés utilisé en microbiologie nous citons quelques exemples:

1 – le bleu de bromothymol : Qui vire du jaune (au dessous du pH 6) au vert (à la neutralité) puis au bleu (à l'alcalinité, à partir du pH 7,8).



2 - le bromocrésol pourpre : Qui vire du jaune orange (au dessous du pH 5,4) au violet (des la neutralité).



3 - le rouge de phénol : Qui vire du jaune (au dessous du pH6,4) à l'orange (à la neutralité) puis au rouge carmin (à l'alcalinité, à partir du pH8).



4 - la teinture de tournesol: Qui vire du rouge (au dessous du pH5) au violet (au environ du pH6) puis au bleu (à l'alcalinité, à partir du pH8).



Dans le cas de notre étude, nous avons ciblé le choix de l'indicateur coloré le plus sensible parmi les indicateurs suivants : le pourpre de bromocrésol, le rouge de bromophénol, le bleu de bromothymol, le rouge neutre et le rouge de phénol. Cette gamme a été choisie sur le faite qu'elle possède une bonne sensibilité au pH car le virage se fait à une limite inférieure

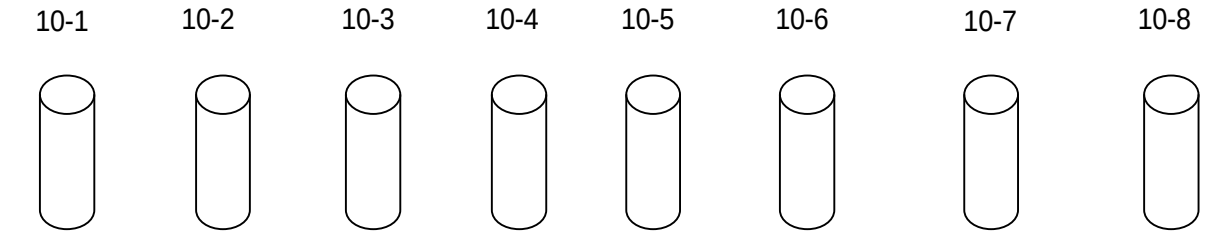
proche de la neutralité. Un indicateur optimal donne à partir d'un milieu de pH neutre un virage bien clair et rapide des que le pH du milieu commence à diminuer suite à une croissance d'un inoculum le plus petit que possible. Ceci permet de raccourcir le temps de réponse et d'augmenter la sensibilité de la méthode. Cependant, suite à des contraintes liées à la disponibilité de ces indicateurs, nous avons pu tester uniquement le rouge de phénol, le pourpre de bromocrésol et le bleu de bromothymol.

Tableau 12: Zones de virage de quelques indicateurs colorées.

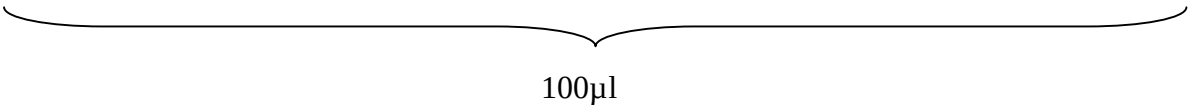
Les indicateurs colorés	pH	Zone de virage
Pourpre de bromocrésol	**5.2 – 6.8**	**Jaune – violet bleuté**
Rouge de bromophénol	**5.2 – 6.8**	**Jaune – rouge**
Bleu de bromothymol	**6.0 – 7.6**	**Jaune – bleu**
Rouge neutre	**6.8 – 8.0**	**Rouge – jaune brun**
Rouge de phénol	**6.4 – 8.0**	**Jaune – rouge**

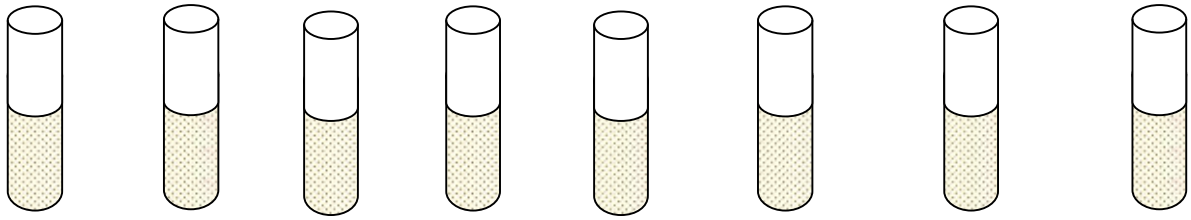
Il faut signaler que cette partie permet aussi de déterminer le nombre minimal de bactéries qui induit un virage de la couleur du milieu pour chaque indicateur coloré. Ce qui nous permet aussi de sélectionner l'indicateur le plus sensible. La démarche expérimentale est la suivante (**Figure.11**):

- A partir de la suspension mère de *M. luteus* de l'ordre de 250.10^{12} UFC/ml, réaliser des dilutions (de 10 en 10) dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-8}.
- Remplir une série de tubes en verre stériles de 5ml avec 1ml du milieu Mueller et Hinton maintenu en surfusion (à 45°C).
- Ajouter 100µl de chaque dilution au milieu et laisser solidifier.
- Incuber à 30-37°C pendant 24h en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure.



UFC/ml *M. luteus*	250.10^{11}	250.10^{10}	250.10^{9}	250.10^{8}	250.10^{7}	250.10^{6}	250.10^{5}	250.10^{4}





UFC/ml *M. luteus*	250.10^{10}	250.10^{9}	250.10^{8}	250.10^{7}	250.10^{6}	250.10^{5}	250.10^{4}	250.10^{3}

Figure 11 : Choix de l'indicateur et l'inoculum bactérien : Protocol expérimentale.

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 l'indicateur choisi. Ceci nous permet donc de préciser la charge microbienne qui donne le virage le plus rapide et celle qui donne le virage le plus lent. Le protocole est comme suite:

- A partir de la suspension mère de *M. luteus* de l'ordre de 250.10^{12} UFC/ml, réaliser des dilutions (de 10 en 10) dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-8}.
- Remplir une série de tubes en verre stériles de 5ml avec 1ml du milieu Muller et Hinton maintenu en surfusion (à 45°C).
- Ajouter 100µl de chaque dilution au milieu et laisser solidifier.
- Incuber à 30-37°C pendant 24h en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure.

Test en présence d'échantillon contenant des antibiotiques

Le milieu chargé d'un inoculum minimal (donnant un virage de la couleur en absence d'antibiotique) est testé avec 100µL de jus de viande d'un échantillon positif ayant donné les plus grandes zones d'inhibitions avec la méthode de référence associée à la méthode STAR. L'échantillon est mis en soit contact avec la surface du milieu ensemencé le long de l'incubation (de 24H) ou a été mélangé avec le milieu déjà inoculé maintenu en surfusion. Des témoins sans jus ont été préparés et incubés en parallèle. Un contrôle du virage de la couleur du milieu est indispensable à chaque 30min.

c- Méthode en tube sur mannitol mobilité:

Nous avons utilisé le milieu mannitol mobilité, milieu semi-solide, contenant le rouge de phénol comme indicateur coloré. La composition ainsi que la préparation de ce milieu sont détaillés en **annexe I**. Une fois ensemencée par une souche mannitol +, la dégradation du mannitol entraine une acidification du milieu qui change de couleur du rouge vermillon au jaune.

Dans cette partie, nous avons aussi utilisée *M. luteus* (souche la plus sensible). Pour pouvoir se multiplier, la souche utilisée doit avoir la faculté de dégrader le mannitol. Un test biochimique de dégradation du mannitol a été réalisé en tube à essai en verre, coulé en culot par le milieu mannitol mobilité. Après solidification, la souche à tester est ensemencée par piqure centrale. Le tube est ensuite incubé à 30-37°C pendant 24h.

Optimisation de l'inoculum bactérien

Le but de cette partie est la détermination du nombre minimal de bactéries qui induit un virage de la couleur du milieu. La démarche expérimentale est la suivante (**Figure.12**):

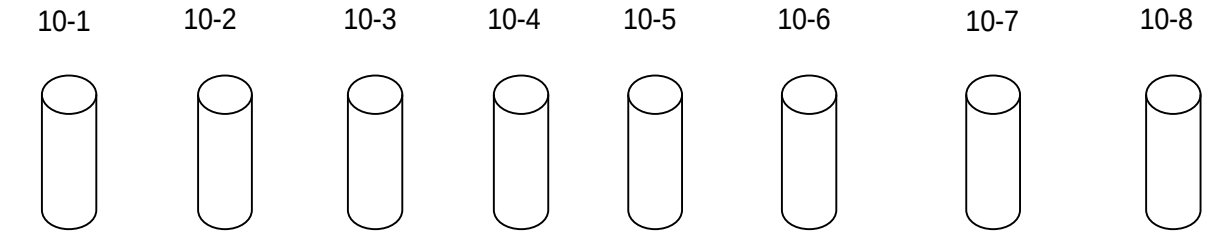
- A partir de la suspension mères de *M. luteus* de l'ordre de 177.10^{11} UFC/ml, réaliser des dilutions (de 10 en 10) dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-8}.
- Remplir une série de tubes en verre stériles de 5ml avec 1ml du milieu mannitol mobilité maintenu en surfusion (à 45°C).
- Ajouter 100µl de chaque dilution au milieu et laisser solidifier.
- Incuber à 30-37°C pendant 24h en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure.

Test en présence d'échantillon contenant des antibiotiques

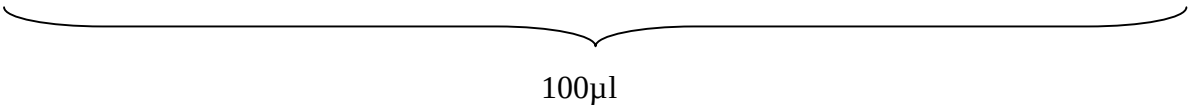
Dans cette partie, les dilutions ayant donné un virage de la couleur du milieu ont été testées en présence de 100µL de jus de viande d'un échantillon positif ayant donné les plus grandes zones d'inhibitions avec la méthode de référence associée à la méthode STAR. L'échantillon est mis en contact avec la surface du milieu ensemencé le long de l'incubation (de 24H). Des témoins sans jus ont été préparés et incubés en parallèle. Un contrôle du virage de la couleur du milieu est indispensable à chaque 30min.

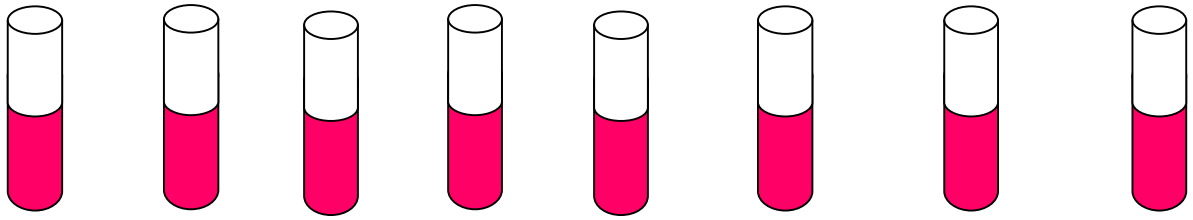
Optimisation de la hauteur du milieu

Afin d'assurer une bonne diffusion du résidu d'antibiotique d'un échantillon dans le milieu, nous avons réduit le volume du milieu mannitol mobilité semi-solide de 1ml à 0,25ml. Un volume de 25µL de chaque dilution bactérienne est ajouté au milieu maintenu en surfusion. Après solidification, 100µl de jus de viande est ajouté en surface. Les tubes sont incubés à 30-37°C pendant 24h en surveillant le virage de la couleur à des intervalles d'une demi-heure. Des témoins sans jus ont été préparés et incubés en parallèle.



UFC/ml *M. luteus*	**177.10^{10}**	**177.10^{9}**	**177.10^{8}**	**177.10^{7}**	**177.10^{6}**	**177.10^{5}**	**177.10^{4}**	**177.10^{3}**





UFC/ml *M. luteus*	**177.10^{9}**	**177.10^{8}**	**177.10^{7}**	**177.10^{6}**	**177.10^{5}**	**177.10^{4}**	**177.10^{3}**	**177.10^{2}**

Figure 12: Optimisation de l'inoculum bactérien : Protocol expérimentale.

1. Sondage sur terrain

Pour l'élevage avicole, le sondage auprès du pharmacien grossiste nous a donné une vue générale sur les molécules les plus consommées sur le terrain algérien:

- Les Beta-lactamines : Ampicilline, Amoxicilline, Pénicilline G et Oxacilline,
- Les Tétracyclines : Chlorotétracycline et Tétracycline,
- Les Sulfamides : Sulfathiazol,
- Les Aminosides : Gentamycine et Streptomycine,
- Les Macrolides : Erythromycine,
- Les Quinolones : Enrofloxacine.

Auprès du vétérinaire, nous avons obtenu un schéma général de l'usage des antibiotiques pendant l'élevage du poulet destiné à la consommation depuis J0 à J60 **(Figure.13)**.

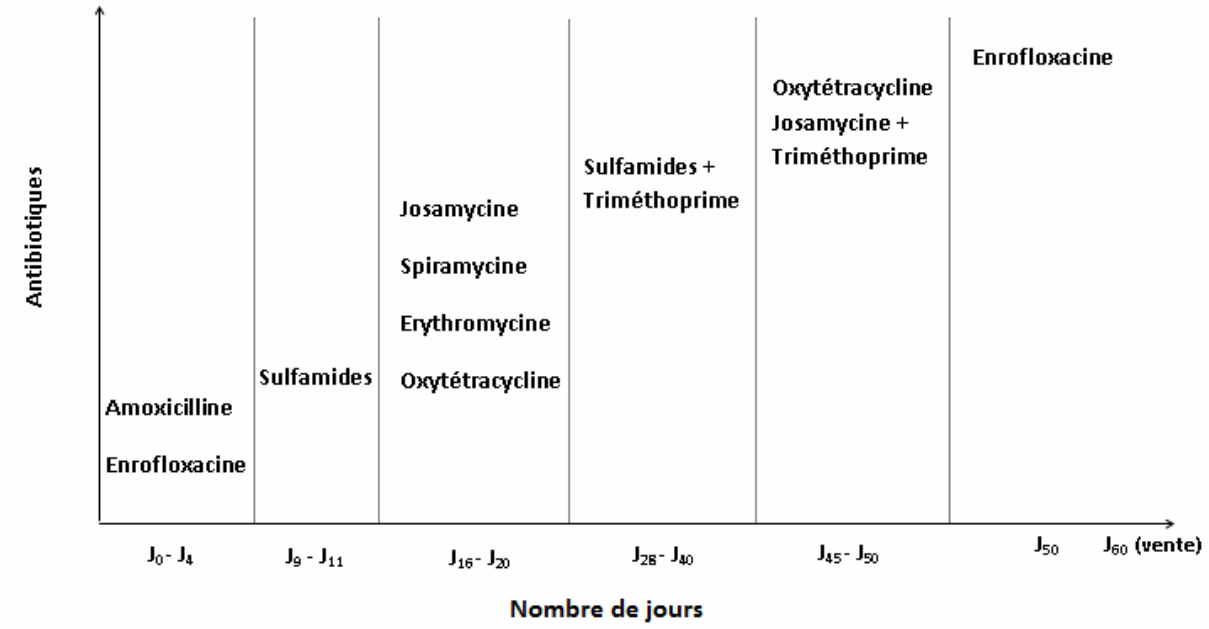


Figure 13 : Exemple d'un schéma de gestion de l'antibiothérapie chez un élevage de poulet.

Pour l'élevage bovin et ovin, notre sondage auprès du vétérinaire et du pharmacien grossiste, nous a révélé que les antibiotiques ne sont pas systématiquement utilisés sauf en cas d'infections mettant en jeu la vie de l'animale, du cheptel ou mettant en jeu la qualité de la production (lait ou viande) (infection respiratoires, mammites, ….). Les antibiotiques généralement utilisés dans ce cadre dans le terrain algérien sont:

- Les Tétracyclines (Oxytétracyclines), les Béta-lactamines (Amoxicilline et Pénicilline), les Macrolides et les Quinolones (Enrofloxacine) pour les infections respiratoires,
- Les Macrolides (Tylosine et Erythromycine) pour les infections des pieds,
- Les Aminosides (Gentamycine) pour les infections urinaires,

Dans la région du sud algérien (Ain ouassara), les cheptels ovins sont menacés périodiquement par des infections pulmonaires dues à *E. coli*. Ces élevages sont traités à titre préventif par des Béta-lactamines juste avant l'hiver.

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 (un antibiotique à usage vétérinaire utilisé en élevage avicole), 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 (surtout en élevage avicole); 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.
- Pour l'élevage avicole, 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 possibilité d'avoir des résidus dont la teneur est supérieur à la LMR
- Dans le cas des élevages d'ovin et de bovin, l'échec d'antibiothérapie accompagné d'une détérioration de l'état de l'animal est une indication à l'abattage d'urgence. Dans la plus part des cas, cet abattage est effectué pendant les délais d'attente. Ce qui entraine la présence des résidus d'antibiotiques à des teneures supérieures à la LMR.

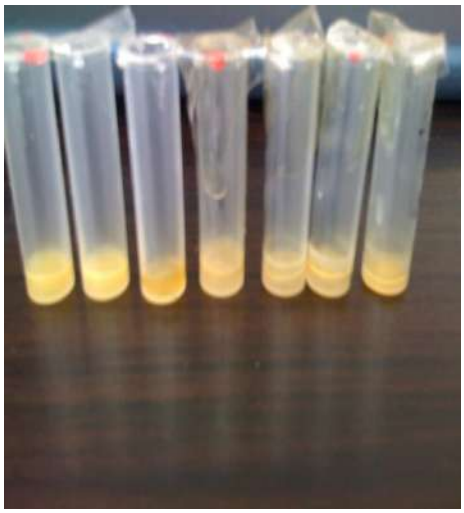
2. Analyses microbiologiques au laboratoire par les méthodes officielles

Il faut rappeler que nous avons utilisé deux méthodes microbiologiques:

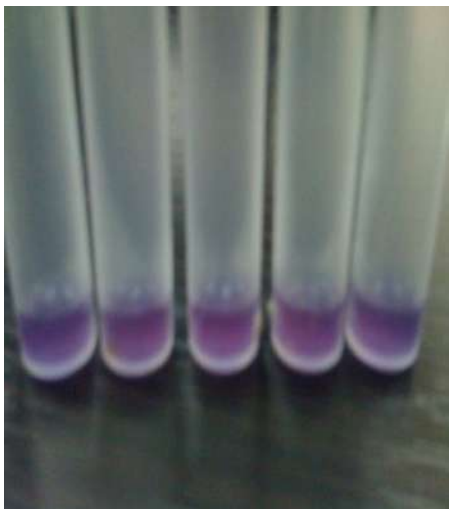
- Une méthode générale qui permet de dépister la présence ou l'absence des antibiotiques, il s'agit du **Prémi®Test**,
- Une méthode plus spécialisée qui permet de distinguer entre les familles des antibiotiques éventuellement présentes, il s'agit de la **méthode de référence (quatre boites)** associée à la **méthode STAR**.

2.1. Présélection par Prémi®Test

Après incubation des échantillons [foie, muscle poulet, bovin, ovin et caprin], nous considérons les échantillons ayant gardé leur couleur violette comme positifs et les échantillons dont la couleur a viré vers le jaune comme négatifs **(Figure.14)**. Les résultats obtenus sur 95 échantillons prélevés, 30 échantillons de Bovins, 13 échantillons d'ovin, 1 échantillon de caprin, 31 bréchets et 20 foies sont représentés sur le **Tableau 13** et la **Figure 15.**



Cas d'échantillons négatifs



Cas d'échantillons positifs

Figure 14: **Exemple de lecture d'un Prémi®Test après incubation.**

Tableau 13: Résultats globaux obtenus pour le Prémi®Test.

Echantillons	Foie	Muscle de poulet	Bovin	Ovin	Caprin
(Nombre /Pourcentage) des échantillons positifs	3(15%)	10(32.2%)	8 (26.6%)	0(0%)	0
(Nombre /Pourcentage) des échantillons négatifs	17(85%)	21(67.7%)	22(73.3%)	13(100%)	1
Echantillons positifs totaux	21 (22.10%)				
Echantillons négatifs totaux	74 (77.89%)				

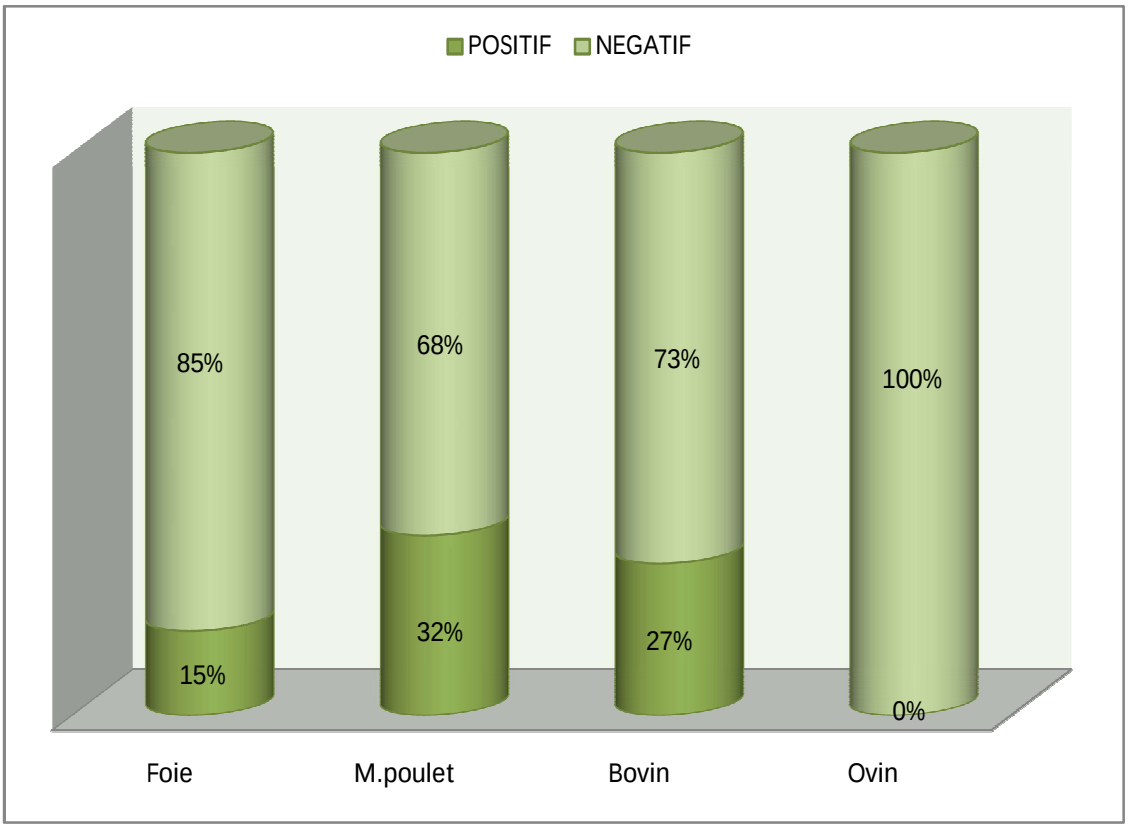


Figure 15 : Résultat de Prémi®test pour les différents échantillons prélevés.

Nous constatons, que le pourcentage des échantillons positifs pour le muscle de poulet est plus important que celui des échantillons de foie. Dans le cas des viandes rouges le taux de positivité est marqué uniquement dans le cas des bovins. Les échantillons d'ovins analysés sont tous négatifs ainsi que le seul échantillon de caprin. En comparant les résultats obtenus pour les viandes blanches et les viandes rouges, nous constatons que leurs taux de positifs sont proches (**Figure.15**).

2.2. Confirmation par la méthode de référence associée à la méthode STAR :

Il faut rappeler que nous avons d'abord contrôlé la sensibilité de nos souches avant d'entamer la technique proprement dite.

2.2.1. Contrôle de la sensibilité des souches

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés sur le **tableau 14** et la **figure 16**.

Tableau14 : Diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour chaque souche.

	Diamètres d'inhibition (mm)				
	E. coli	*B. subtilis*		*M. luteus*	
		Souche 1	*Souche 2*	*Souche 1*	*Souche 2*
Pénicilline G	20	44	33	66	40
Ampicilline	23	40	33	60	32
Chlorotétracycline	20	41	25	40	30
Oxacilline	18	27	18	De grandes Zones d'inhibition Immesurable	25
Amoxicilline	24	31	29		29
Erythromycine	23	35	30		30
Sulfamide	19	20	15		15
Enrofloxacine	40	33	25		30
Streptomycine	35	38	29		35
Gentamicine	25	20	31		40

Souche 1 : souche de SAIDAL
Souche 2 : Souche fournie par le professeur SABAO, laboratoire de microbiologie, ENS kouba, Alger.



E. coli



B. subtilis (souche1)



B. subtilis (souche2)



M. luteus (souche1)



M. luteus (souche2)

Figure 16 : Zones d'inhibitions obtenues pour les différentes souches.

Les diamètres d'inhibitions obtenus pour les différentes souches en contact avec les différents antibiotiques sont comparés avec ceux du tableau de lecture de référence (**Cf. tableau 10**) afin de se prononcer sur la sensibilité de nos souches (**Tableau 15**).

Tableau15 : Résultat final de l'antibiogramme.

	Diamètres d'inhibition (mm)				
	E. coli	*B. subtilis*		*M. luteus*	
		Souche 1	*Souche 2*	*Souche 1*	*Souche 2*
Pénicilline G	R	S	S	S	S
Ampicilline	S	S	S	S	S
Chlorotétracycline	S	S	S	S	S
Oxacilline	R	S	S	S	S
Amoxicilline	S	S	S	S	S
Erythromycine	S	S	S	S	S
Sulfamide	S	S	S	S	S
Enrofloxacine	S	S	S	S	S
Streptomycine	S	S	S	S	S
Gentamicine	S	S	S	S	S

A l'exception d'*E. Coli* qui présente une résistance vis-à-vis de deux Béta-lactamines (Pénicilline G et Oxacilline), toutes les souches sont sensibles à tous les antibiotiques testés. *M. luteus* est la souche la plus sensible. En comparant les diamètres d'inhibitions obtenues pour les deux souches de *B. subtilis et M. luteus* (**Tableau 15**), nous pouvons affirmer que les souches de SAIDAL sont plus sensibles. La résistance marquée pour *E .coli* vis-à-vis des deux Béta-lactamines est sans retentissement négatif sur notre technique de dépistage puisque cette souche est utilisée pour le dépistage des quinolones et plus spécialement l'enrofloxacine auquel elle est sensible.

En conclusion, nos souches sont détectrices des résidus d'antibiotiques. Pour la suite de notre travail, nous allons utiliser les souches les plus sensibles parmi *B. subtilis et M. luteus*.

2.2.2. Résultats obtenus

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 (ou les disques standards) et la limite de la croissance. Nous rappelons qu'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.

Afin de vérifier la conformité des souches test utilisées ainsi que les conditions de travail nous commençons par la lecture des zones d'inhibition situées autour des disques d'antibiotiques témoins. Les résultats figurent sur le **tableau 16** et la **figure 17**. Nous constatons que les diamètres zones d'inhibitions obtenues pour les témoins sont tous supérieurs à 6mm. Les conditions de travail sont donc conformes; Nous pouvons donc prendre en considération les résultats obtenus pour les échantillons.

Nous représentons sur la **figure 18** des exemples des zones d'inhibition obtenues pour les échantillons analysés **(dimensions Cf. annexe III)**.

Tableau 16: Diamètres moyens obtenus pour les solutions témoins.

Espèce	pH	Antibiotiques	Diamètre moyen de la zone d'inhibition (mm)	Zone annulaire (mm)
B. Subtilis	6.0	Pénicilline G	32	11
	7.4	Sulfathiazol	9	3
	8.0	Dihydrostreptomycine	Zone importante	Zone importante
M. Luteus	8.0	Erythromycine	18	6
E. Coli	8.0	Enrofloxacine	26	9

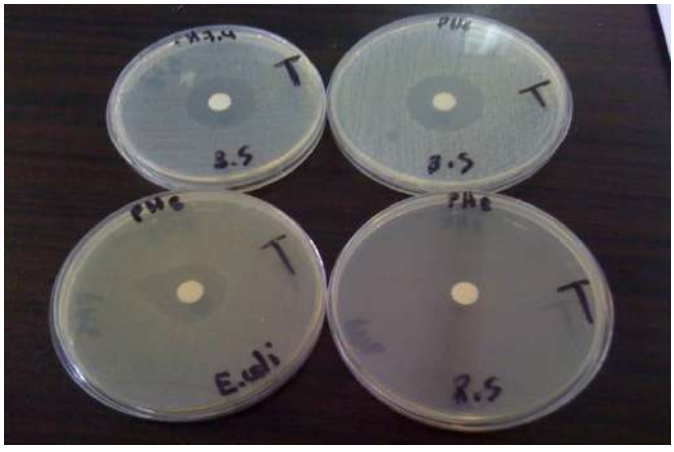


Figure 17 : Résultats des témoins après incubation



Echantillons de bovin **Echantillons de muscle de poulet**

Figure 18: Résultats des échantillons analysés après incubation.

a- Expression du résultat global :

L'analyse des 95 échantillons (foie, muscle de poulet, bovin et ovin) par la méthode de référence a révélé les résultats représentés sur le **tableau 17** et la **figure 19.**

Tableau 17: Résultats globaux obtenus pour la méthode des quatre boites associée à la Méthode STAR.

Echantillons	Foie	Muscle de poulet	Bovin	Ovin	Caprin
(Nombre /Pourcentage) des échantillons positifs	3(15%)	10(32.2%)	8(26.6%)	0(0%)	0
(Nombre /Pourcentage) des échantillons négatifs	14(70%)	18(58%)	22(73.3%)	13(100%)	1
(Nombre /Pourcentage) des échantillons douteux	3(15%)	3(9.67%)			
Echantillons positifs totaux	21 (22.10%)				
Echantillons négatifs totaux	68 (71.57%)				
Echantillons douteux totaux	6 (6.31%)				

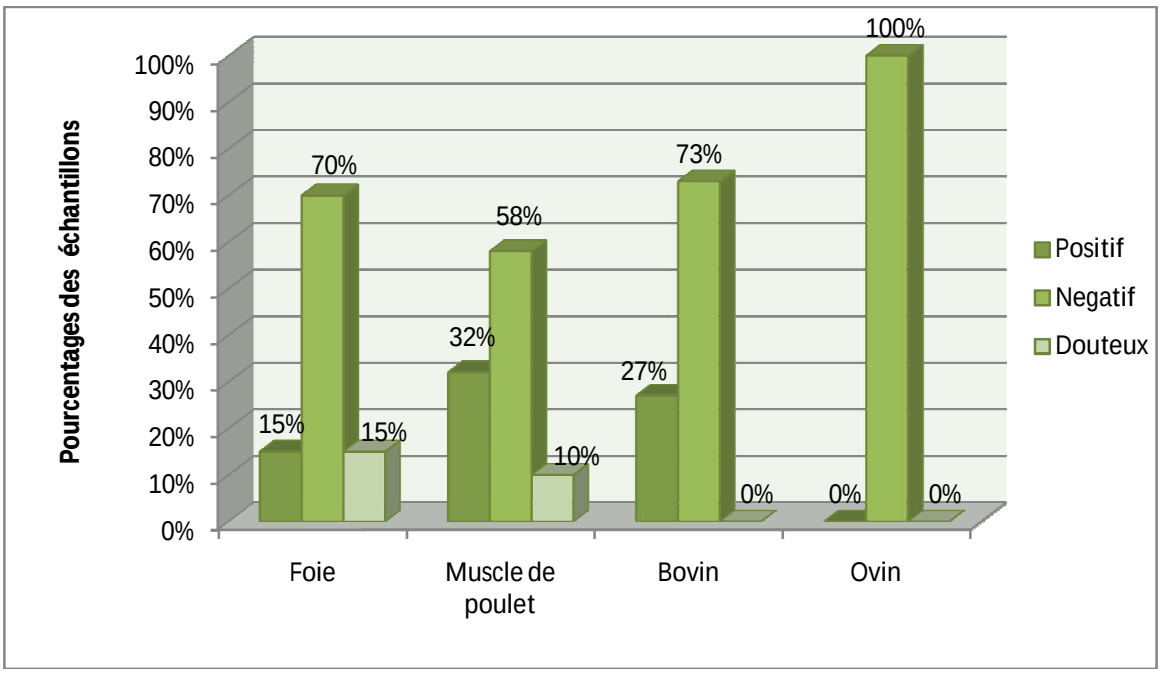


Figure 19: Résultat globale de la méthode des quatre boites associée à la méthode STAR pour les échantillons : foie, muscle de poulet, bovin, ovin.

Nous signalons qu'il n'ya pas une différence dans le pourcentage des échantillons positifs par rapport au Prémi®Test. Le Prémi®Test est connu par sa grande sensibilité, la souche employée dans ce test est très sensible à la plus part des antibiotiques. Il suffit donc d'avoir une teneur située à la limite de la LMR (C=LMR) pour rendre ce test positif. Pour tous les échantillons (foie, muscle de poulet, bovin, ovin) : les deux méthodes présentent les mêmes taux de positifs : ce qui est détecté par le Prémi®Test est bien confirmé par la méthode des quatre boite (+STAR). Cependant, parmi les 74 échantillons négatifs (détectés par le Prémi®Test), nous avons 6 échantillons classés comme douteux par la méthode de référence.

En Algérie, plusieurs études ont ciblé la fraude dans la production aviaire vis-à-vis la présence de résidus d'antimicrobiens, le taux de positivité est apparemment variable d'une étude à une autre, il est de :

• 3,33% dans la région d'Alger (*Ben Mohand. C, 2008***)**,

• 65,7% dans la région d'El-Taref (*Mansouri. N, 2007***)**

• 28,85% dans la région de la kabylie (*Kenniche et Riat, 2003***)**, et 29,03% dans les mêmes wilayas du centre algérien (*Boussila. F, 2009*).

Ces derniers taux sont très proches de celui trouvé dans notre étude pour les échantillons de viandes blanches (22.10%).

Dans une étude réalisée à Dakar sur un échantillonnage de Bovin, Ovin et poulet, *Châtaigner. B et Stevens. A, 2002* ont trouvé 42% de bovins positifs, contre seulement 11,4% de positifs chez les ovins et 3 % chez les poulets.

b- Résultats par rapport à chaque famille d'antibiotique

Afin de donner plus de précision concernant les familles d'antibiotiques dépistées, nous avons représenté la répartition des 3 échantillons positifs de foie par rapport à chaque famille d'antibiotique testée (**Tableau 18**). Les trois échantillons de foie contiennent les Béta-lactamines ou Tétracycline **(Tableau 18)**, seulement nous ne pouvons pas tenir compte du pourcentage calculé sur trois échantillons pour tirer les antibiotiques les plus utilisés.

Concernant les échantillons de muscle de poulet, les pourcentages des différentes familles dépistées sont représentés sur le **tableau 19** et la **figure 20**.

Tableau 18: Nature des résidus d'antibiotiques présents dans les échantillons de foie.

Famille	Béta-lactamines /Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Béta-lactamines et macrolides	Quinolones
Nombre de positifs	3	0	0	0	0

Tableau 19: Familles dépistées au niveau des échantillons de muscle de poulet.

Famille	Béta-lactamines /Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Béta-lactamine et Macrolides	Quinolones
Nombre de positifs	4	2	8	0	5
% positif	40	20	80	0	50

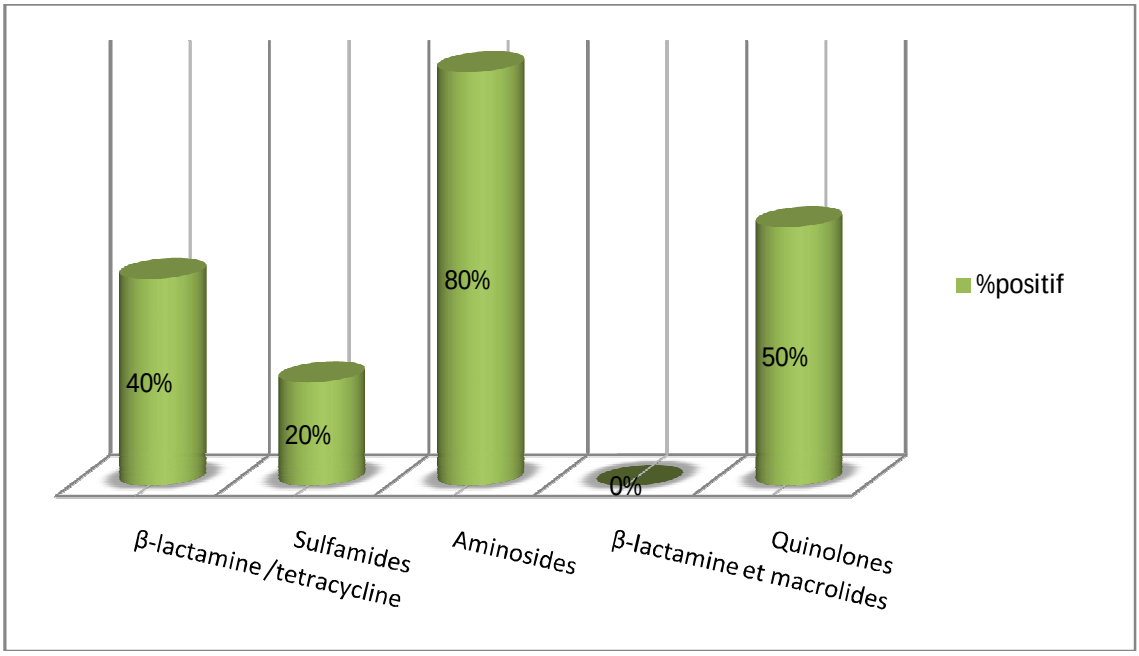


Figure 20: Représentation graphique des échantillons de muscle de poulet positifs par rapport aux familles d'antibiotiques.

Parmi les échantillons de viande blanche positifs, la famille des aminosides occupe le pourcentage le plus élevé d'utilisation (80%), suivie des quinolones (50%) puis les tétracyclines (40%) et finalement les sulfamides (20%). Les macrolides ne sont pas dépistés (0%). Les quinolones (plus précisément l'Enrofloxacine) sont utilisées pendant la phase de finition, ce qui explique leur apparition. Parmi les six échantillons de poulet douteux (foie et muscle), 4 échantillons (1 de foie et 3 de muscle de poulet) sont suspectés contenir des résidus de béta-lactamines ou tétracyclines, 2 échantillons de foie sont douteux pour les quinolones (**annexe III**).

Finalement, les pourcentages des différentes familles dépistées au niveau des viandes rouges (Bovines), sont représentés sur le **tableau 20** et la **figure 21**.

Tableau 20: Répartition des échantillons de bovin positifs par rapport aux familles d'antibiotiques dépistées.

Famille	Béta-lactamines /Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Béta-lactamines et macrolides	Quinolones
Nombre de positifs	3	7	8	0	8
% positif	37.5%	87.5%	100%	0%	100%

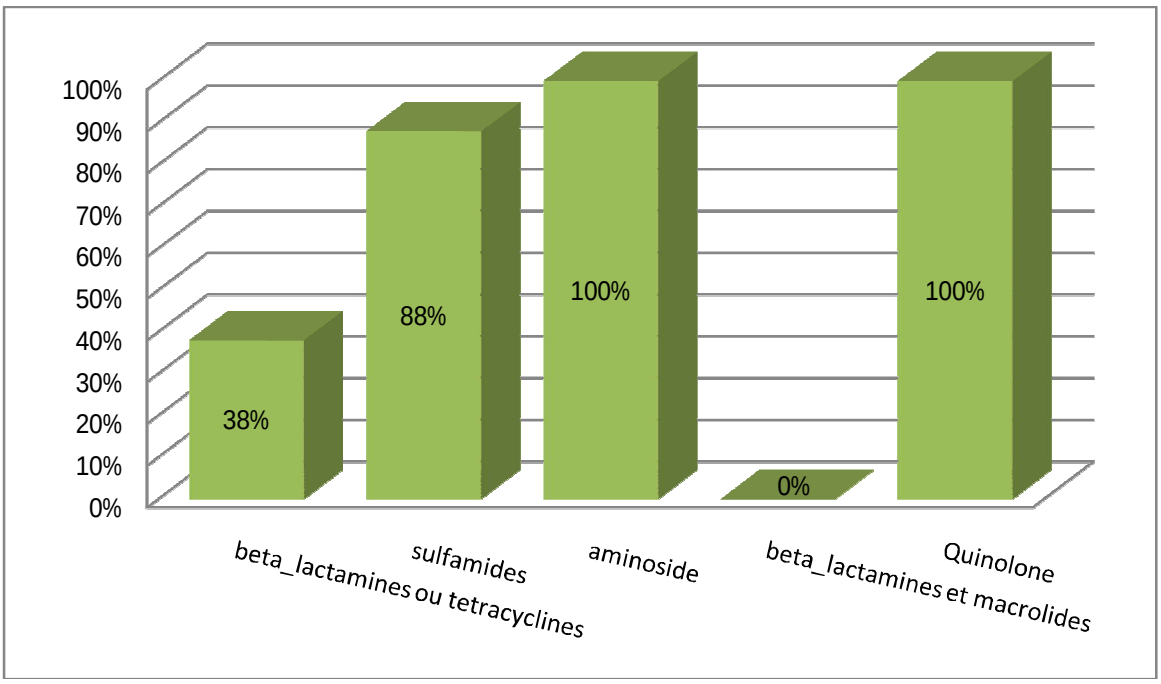


Figure 21 : Représentation graphique des échantillons de bovin positifs par rapport aux familles d'antibiotiques.

Parmi les échantillons positifs, la famille des aminosides et quinolones occupent le pourcentage le plus élevé d'utilisation (100%), suivies par les sulfamides (88%), les tétracyclines (38%) et en dernier les macrolides (0%). Ce résultat concorde bien avec les données rapportées par le sondage.

c-Résultats par rapport aux nombre de résidus d'antibiotiques dans chaque échantillon

Les résultats obtenus après le classement des échantillons positifs de muscle de poulet par rapport aux nombres de résidus d'antibiotique présent (association) sont représentés sur le **tableau 21** et la **figure 22**.

Tableau 21 : Pourcentage des échantillons de muscle de poulet positifs par rapport au nombre de résidus d'antibiotiques.

Nombre d'ATB	1 ATB	2 ATB	4 ATB
% positif	**50%**	**30%**	**20%**
Association (%)	**50%**		

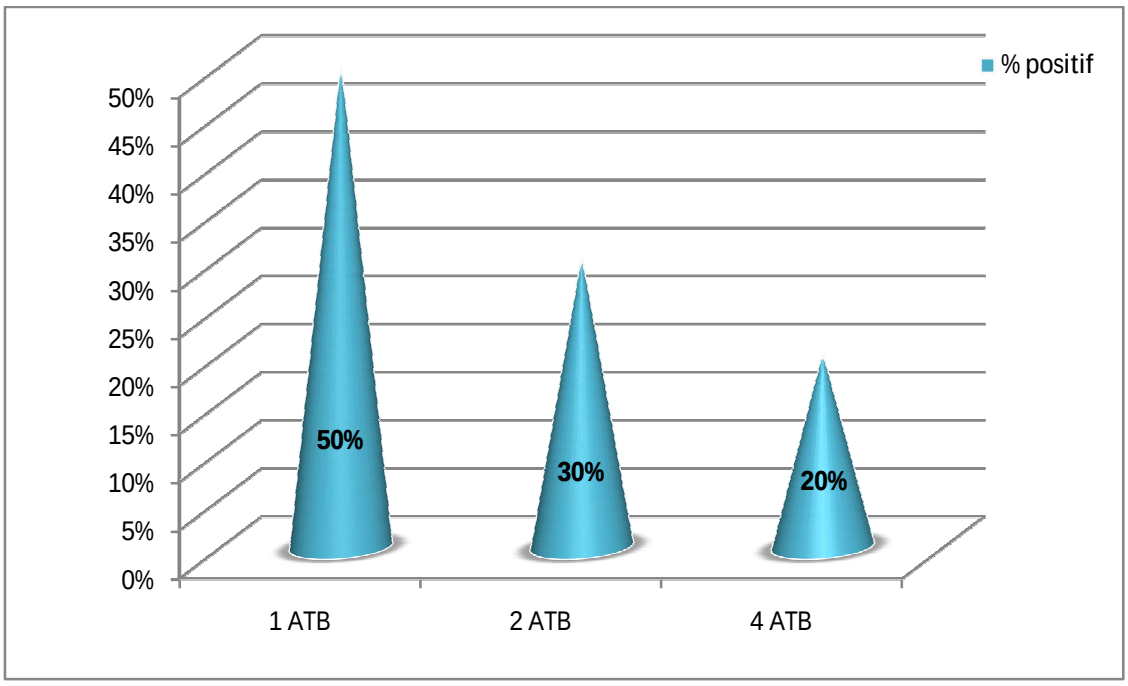


Figure 22 : Représentation graphique de la répartition des échantillons de muscle de poulet positifs sur la base du nombre de résidus présents.

La moitié des résidus d'antibiotiques se trouvent en association (50%), l'association à deux antibiotiques est prédominante (30%). Le pourcentage de l'association à quatre antibiotiques est de 20%.

Les résultats obtenus après le classement des échantillons positifs de muscle de bovin par rapport aux nombres de résidus d'antibiotiques présents (association) sont représentés sur le **Tableau 22** et la **Figure 23**.

Tableau 22 : Pourcentage des échantillons de muscle de bovin positifs par rapport au nombre de résidus d'antibiotiques.

Nombre d'ATB	3 ATB	4 ATB
% positif	**75%**	**25%**
Association (%)	**100%**	

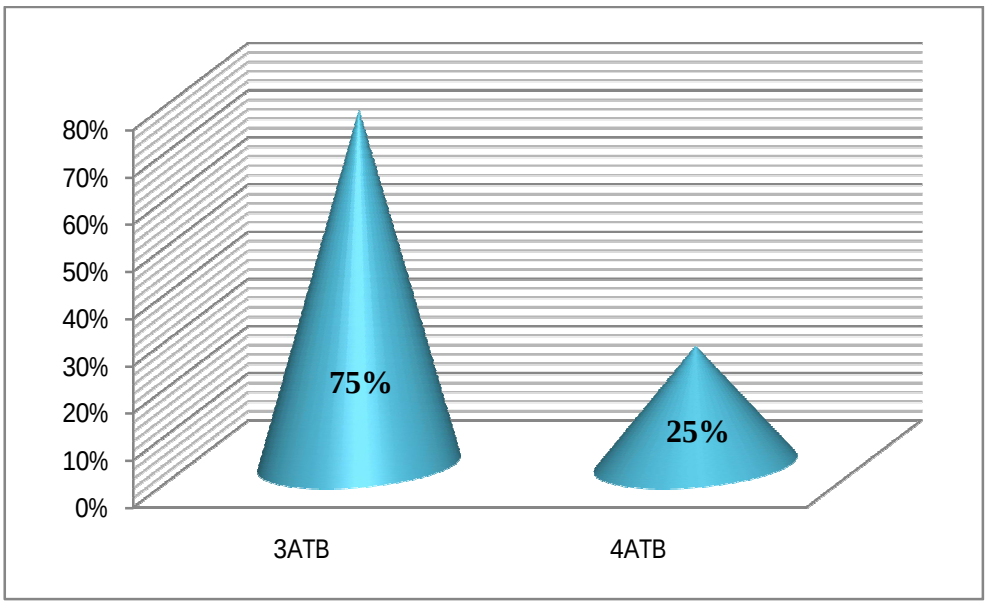


Figure 23 : Pourcentage des échantillons de muscle de bovin positifs par rapport au nombre de résidus d'antibiotiques.

La contamination des viandes rouges bovines en résidus d'antibiotique est souvent liée à la présence de trois familles (75%) suivie par la contamination par quatre types d'antibiotiques (25%). En consultant la fiche de renseignement concernant les échantillons prélevés, nous n'avons pas eu d'information quand à la nature de l'abattage. Ce résultat pourrait être expliqué par la possibilité d'échantillons issus d'abattage d'urgence.

2.3. Mise au point de méthodes alternatives

Ce volet a commencé par la recherche de souches multi-sensibles afin de les utiliser pour le dépistage des résidus d'antibiotique en une seule boite ou en tubes au niveau des échantillons positifs de poulet et de Bovin (exclusion des échantillons de foie).

2.3.1. Test de la sensibilité des souches choisies

Il faut rappeler que nous avons choisie comme première souche *Micrococcus luteus* dont l'antibiogramme (déjà réalisé en partie 2.2.1) a prouvé sa grande sensibilité à des antibiotiques appartenant à plusieurs familles par rapport autres souches testées (*E. coli*, *B. subtilis*).

Deux autres souches ont été contrôlées pour leurs sensibilités aux antibiotiques: *Bacillus stearothermophilus* et *Staphylococcus aureus*. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenues sont représentés sur le **tableau 23** et la **figure 24**. Sur le même tableau (**Tableau 23**), nous

avons donné les résultats définitifs de l'antibiogramme après comparaison avec le tableau de lecture (**Tableau 10**).

Les deux souches sont bien sensibles aux antibiotiques testés. *Bacillus stearothermophilus* est plus sensible que *S. aureus*. *M. luteus* reste la plus sensible.

Tableau 23 : **Résultats de l'antibiogramme de *B. stearothermophilus* et *S. aureus*.**

	Diamètres d'inhibition (mm) / Résultat			
	B. stearothermophilus		***S. aureus***	
Pénicilline G	58	S	44	S
Ampicilline	52	S	40	S
Chlorotétracycline	36	S	34	S
Oxacilline	60	S	33	S
Amoxicilline	54	S	43	S
Erythromycine	40	S	32	S
Sulfamide	32	S	19	S
Enrofloxacine	40	S	35	S
Streptomycine	46	S	30	S
Gentamicine	36	S	28	S



B. stearothermophilus



S. aureus

Figure 24 : **Zones d'inhibitions obtenues pour *B. stearothermophilus* et *S. aureus***

2.3.2. Méthode en une seule boite

a-Choix du milieu

L'objectif de cette partie est de choisir un milieu adéquat à une bonne diffusion des résidus d'antibiotiques à partir de leurs matrices. Nous avons testé deux milieux pour les deux souches les moins sensibles (*B. stearothermophilus* et *S. aureus*): le Mueller/Hinton et le Soja Agar. Pour *S. aureus*, nous avons testé un troisième milieu qui lui est sélectif : il s'agit du milieu Chapman.

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus sont représentés sur le **tableau 24** et **figure 25**.

D'une façon générale, le milieu Mueller et Hinton permet une bonne diffusion des résidus d'antibiotiques à partir des différentes matrices positives testées par rapport au Soja agar:

- Pour *B. stearothermophilus*, 15 échantillons ont été détectés comme positifs parmi 18 échantillons sur Mueller et Hinton. Sur Soja agar seulement 10 échantillons ont été positifs.
- Pour *S. aureus*, les résidus d'antibiotiques ont été dépistés sur 10 échantillons sur Mueller et Hinton, alors qu'aucun échantillon positif n'a été détecté sur Soja agar.

Pour le milieu Chapman, de grandes zones d'inhibition sont apparues de façon chevauchée de telle manière qu'il n'ya pas eu d'apparition de colonies. Cependant, nous avons eu un virage de la couleur du milieu qui pourrait être du soit à une acidification du milieu suite à la libération des jus des viandes à partir de leur matrices, soit un retard de croissance de la souche. Nous ne pouvons pas donc tirer une conclusion quand à l'efficacité de ce milieu dans la détection des résidus d'antibiotiques.

En conclusion, le milieu Mueller et Hinton est retenu pour la suite de notre travail. Ce dernier a permis de nous confirmer que *B. stearothermophilus* est plus sensible que *S. aureus*.

Tableau 24 : Zones annulaires d'inhibitions obtenues pour la méthode en une seule boite sur Mueller/Hinton et Soja agar.

	Zones annulaires (mm)					
	Nature de la matrice	*B. stearothermophilus*		*S. aureus*		
		M. Hinton	*S. agar*	*M .Hinton*	*S. agar*	*Chapman*
E1	Bovin	/	1	3	/	De grandes zones d'inhibitions qui se chevauchent
E2	Bovin	/	3	7	/	
E3	Bovin	2	11	/	/	
E4	Bovin	5	/	2	/	
E5	Bovin	3	/	8	/	
E6	Bovin	4	4	/	/	
E7	Bovin	5	/	7	/	
E8	Bovin	5	/	6	/	
e 1	M. poulet	8	/	/	/	
e 2	M. poulet	10	/	/	/	
e 3	M. poulet	2	/	2	/	
e 4	M. poulet	6	5	/	/	
e 5	M. poulet	1	3	2	/	
e 6	M. poulet	3	5	4	/	
e 7	M. poulet	/	6	/	/	
e 8	M. poulet	4	3	/	/	
e 9	M. poulet	6	7	/	/	
e 10	M. poulet	7	/	5	/	
Nombre de positif	18	15/18	10/18	10/18	0/18	Probablement 18/18



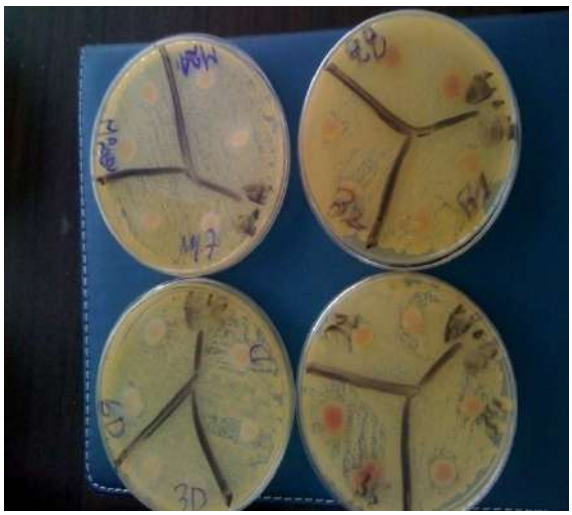
Mueller Hinton



B. stearothermophilus Soja agar



Mueller Hinton



S.aureus Soja agar



S aureus sur Chapman

Figure 25 : Zones d'inhibitions obtenues pour quelques échantillons positifs sur les différents milieux testés.

b-Choix de la souche

Afin de trancher sur la souche compatible, nous avons testé les mêmes échantillons positifs sur le milieu choisi (Mueller et Hinton) en utilisant *Micrococcus luteus*. Les résultats obtenus sont représentés sur le **tableau 25** et la **figure 26**.

Tableau 25: Zones annulaires d'inhibitions obtenues sur Mueller/Hinton pour *M.luteus*.

	Zones annulaires (mm)	
	Nature de la matrice	*Micrococcus luteus*
		M. Hinton
E1	Bovin	3
E2	Bovin	2
E3	Bovin	4
E4	Bovin	2
E5	Bovin	3
E6	Bovin	1
E7	Bovin	6
E8	Bovin	5
e 1	M. poulet	8
e 2	M. poulet	5
e 3	M. poulet	7
e 4	M. poulet	6
e 5	M. poulet	5
e 6	M. poulet	5
e 7	M. poulet	9
e 8	M. poulet	4
e 9	M. poulet	7
e 10	M. poulet	8
Nombre de positif	18	18/18



Figure 26 : Zones d'inhibitions obtenues sur Mueller/Hinton pour *M. luteus*.

Sur Mueller et Hinton, *M. luteus* apparait comme la souche la plus sensible et la plus détectrice des résidus d'antibiotiques : tous les échantillons positifs ont été aussi détectés en utilisant cette souche (**Tableau 24**). Afin d'exclure la présence de faux positifs avec cette souche, nous avons testé sur Mueller et Hinton les échantillons négatifs de poulet et de Bovin (au nombre de 40), et les 3 échantillons douteux de viande blanche et 3 échantillons témoins négatifs obtenus par un élevage de poulet sans antibiotiques. Tous ces échantillons testés ont été révélés comme négatifs sur Mueller et Hinton avec *M. luteus* (**Figure 27**).



Figure 27 : Résultat des échantillons négatifs sur Mueller et Hinton avec *M. luteus*.

En conclusion la méthode du milieu solide en une seule boite est prometteuse à la détection des résidus d'antibiotiques en utilisant *M. luteus* comme souches multi-sensible et Mueller/Hinton comme milieu favorable.

C- Comparaison *Prémi®test* / Méthode en une seule boite :

Les méthodes utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques au niveau des échantillons de viande blanche et rouge sont:

- une Méthodes de présélection ("screening") (*Prémi®test*),
- une méthode de référence (*Méthode des quatre boites*) associée à la *méthode STAR*
- une méthode en une seule boite de Pétri : méthode qui nécessite une validation.

Les résultats obtenus par les trois méthodes sont les suivants:

	Vrais positifs	**Vrais négatifs**	**Douteux**
Quatre boites (référence)	18	40	3

	Positifs	**Négatifs**	**Faux négatifs**	**Faux positifs**
Prémi®test	18	43	3	0
Une seule boite	18	43	3	0

Notre but est de trancher si la nouvelle technique peut remplacer le Prémitest, donc si elle peut servir de test de présélection. Afin d'atteindre cet objectif, les deux techniques doivent être comparées à la méthode de référence. Nous pouvons ainsi calculer les critères suivants (*Feinberg. M, 1996*):

- **La sensibilité :** Echantillons jugés positifs par les deux méthodes/Totalité des échantillons jugés comme positifs et douteux par la méthode de référence. Elle exprime donc le pourcentage des échantillons jugés positifs par la méthode test par rapports aux positifs trouvés par la méthode de référence. ***Se = VP/ (VP + FN)***.
- **La spécificité :** Echantillons jugés Négatif par les deux méthodes / Totalité des échantillons jugés comme négatif par la méthode de référence. Elle exprime donc le pourcentage des échantillons jugés négatifs par la méthode test par rapports aux négatifs trouvés par la méthode de référence. **Sp= VN / (VN + FP),**
- **La valeur prédictive positive :** Echantillons jugés positifs par les deux méthodes/Totalité des échantillons positifs par la méthode test. Elle exprime donc le pourcentage des échantillons réellement positifs parmi l'ensemble des échantillons jugés comme positifs par la méthode test. **VPP = VP / (VP + FP),**

- **La valeur prédictive négative :** Echantillons jugés négatifs par les deux méthodes / Totalité des échantillons négatifs par la méthode test. Elle exprime donc le pourcentage des échantillons réellement négatifs parmi l'ensemble des échantillons jugés négatifs par la méthode test. **VPN = VN / (VN + FN)**.

Où :

VP = vrai positif, **FP** = faux positif, **VN** = vrai négatif, **FN** = faux négatif.

Les critères calculés pour les deux méthodes sont les suivants :

	VPP	VPN	Se	Sp
Prémi®test	1	0.93	0,85	1
Une seule boite	1	0.93	0.85	1

Nous pouvons donc tirer les points suivants :

- Les deux méthodes détectent les positifs à 85% par rapport à la méthode de référence. 15% des échantillons constituent des faux négatifs, mais qui ont été détectés comme douteux par la méthode de référence et non pas positifs (Se=0,85).
- Tout les négatifs détectés par la méthode de référence sont aussi détecté par les deux méthodes, il n'ya pas d'échantillons négatifs jugés comme positifs par les deux méthodes (pas de faux positifs) (Sp=1).
- Les échantillons détectés comme positifs par les deux méthodes ont une probabilité à 100% d'être positifs par la méthode de référence (pas de faux positifs) (VPP=1),
- Les échantillons détectés comme négatifs par la méthode test ont une probabilité de 93% d'être détectés comme négatifs par la méthode de référence (probabilité de faux négatifs) (VPN=0,93).

Les critères de la méthode test (méthode en une seule boite) sont les même que ceux du *Prémi®test.* La nouvelle méthode est valable mai avec une duré d'incubation 24h par rapport à celle du *Prémi®test* (3h). Cependant, du point de vu économique, la nouvelle méthode est moins chère que le *Prémi®test* (technique importée).

2.3.3. 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 (principe identique au *Prémi®test*). Dans cette partie, nous allons essayer de prouver la faisabilité de cette méthode en utilisant:

- une autre souche différente de *B. stearothermophilus : M. luteus*, souche la plus sensible.
- d'autre milieu que celui utilisé en *Prémi®test* (Milieu Mueller et Hinton, mannitol mobilité),
- d'autres indicateurs colorés différent de celui utilisé en *Prémi®test*.

a- Sur milieu Mueller et Hinton :

Dans cette partie, nous avons utilisé le milieu Mueller 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.

Choix de l'indicateur colorés et Optimisation de l'inoculum bactérien:

Les résultats obtenus après incubation montrent les points suivants:

- Nous n'avons pas eu de virage de la couleur au niveau du milieu additionné de pourpre de bromocrésol (**Figure.30**).
- Le milieu additionné de bleu de bromothymol 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 260.10^{7} UFC/ml (**Figure.28**).
- Le milieu additionné de rouge de phénol donne un virage de la couleur du milieu jusqu'au tube ensemencé à partir de la dilution de 10^{-3}, ce qui correspond à un inoculum minimal de 260.10^{8} UFC/ml (**Figure.29**).
- En conclusion, l'inoculum bactérien minimal pour les deux indicateur est presque le même, il est situé entre (10^{7}- 10^{8} UFC/ml).
- Le bleu de bromothymol donne un virage plus net (du vert au jaune) que celui du rouge de phénol (du rouge à l'orange). Le bleu de bromothymol est l'indicateur le plus sensible.

Nous avons donc exclu le pourpre de bromocrésol pour la suite de notre travail et nous avons maintenu les deux autres indicateurs : bleu de bromothymol et rouge de phénol.

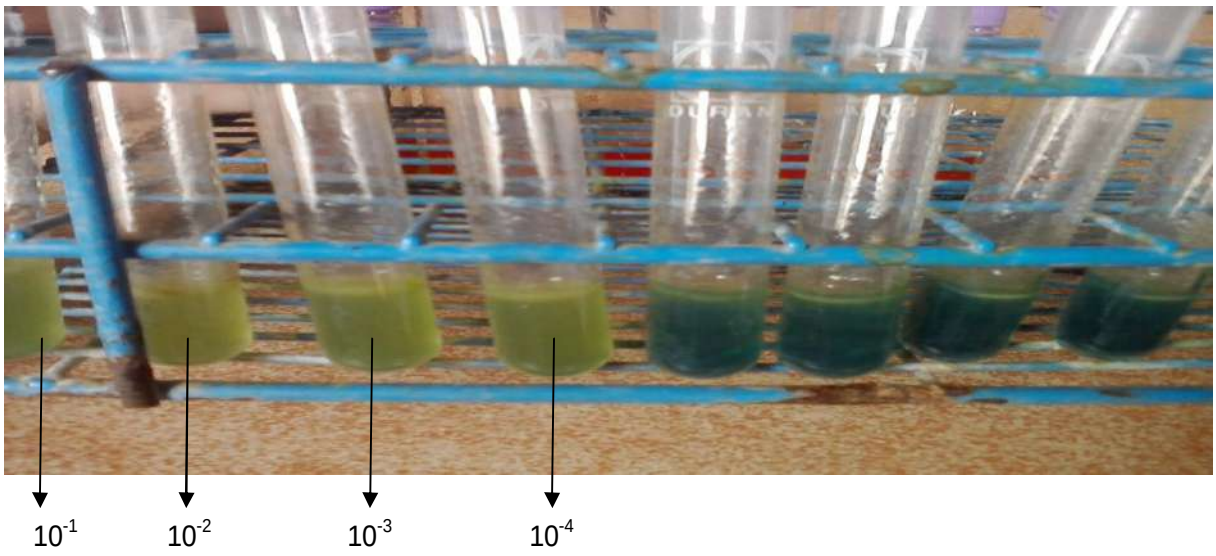


Figure 28 : Virage de couleur du milieu additionné de bleu de bromothymol.

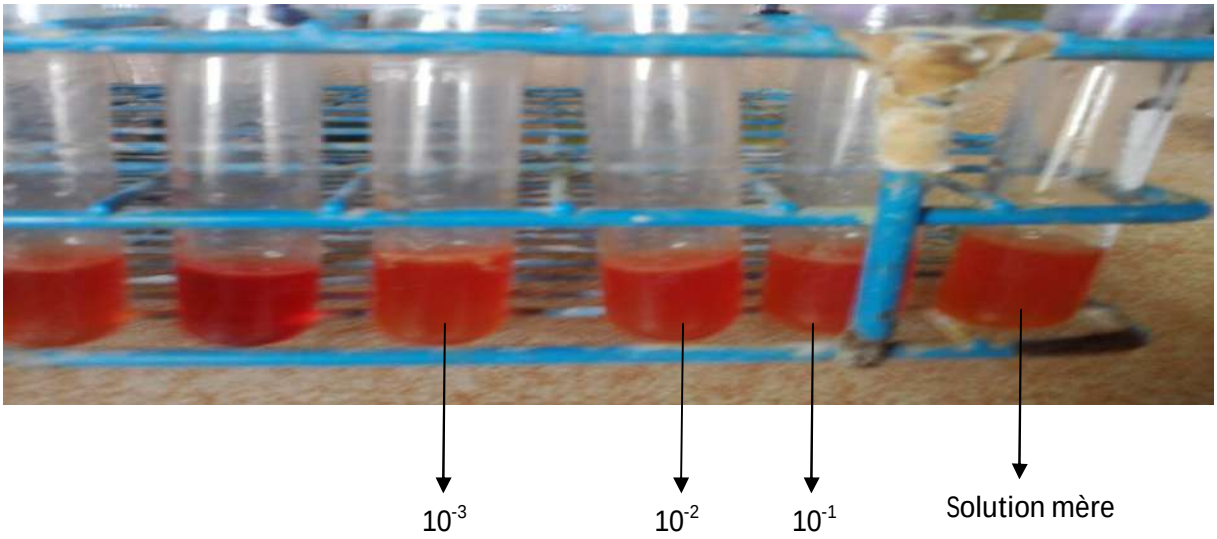


Figure 29 : Virage de couleur du milieu additionné de rouge de phénol.

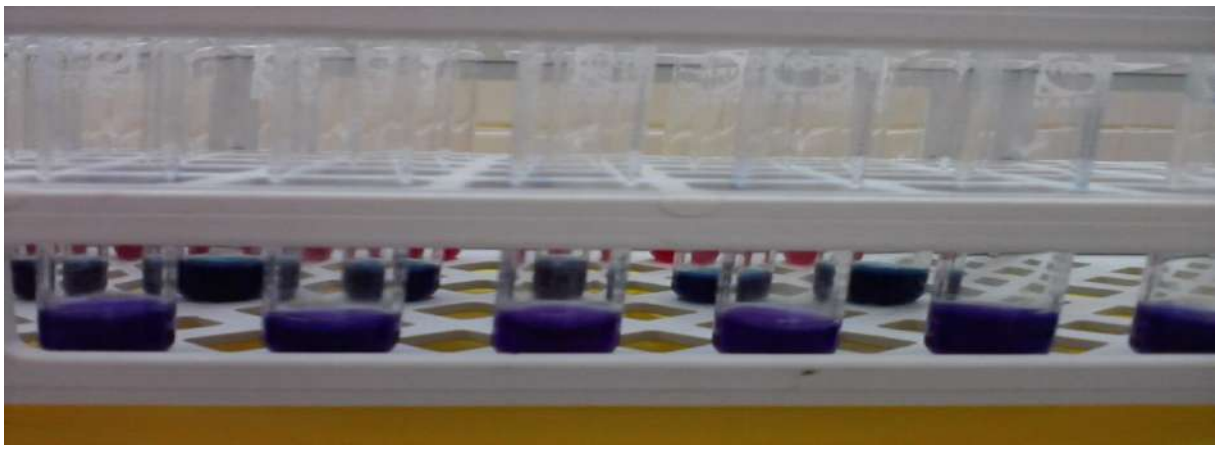


Figure 30: Couleur du milieu additionné de pourpre de bromocrésol après incubation.

Durée d'incubation des tubes :

Au cours de l'étape précédente, nous avons surveillé les tubes à des intervalles de temps réguliers afin de détecter le temps de virage de la couleur des milieux. Le virage de la couleur du bleu de bromothymol a commencé à partir de la 8eme heure d'incubation pour le milieu le plus chargé (250 10^{10} UFC/ml) jusqu'à la 10eme heure pour l'inoculum minimal (260.10^{7} UFC/ml). Dans cette marge de temps le virage du rouge de phénol n'est pas net. Il n'est distingué qu'après 24h.

Test en présence d'échantillon contenant des antibiotiques:

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés surtout aux tubes qui contiennent l'inoculum minimal (pour les deux indicateurs). Après incubation des tubes additionnés de 100µl de jus de viande d'un échantillon positif avec leurs témoins (sans jus) à 30-37°C pendant 24h, les résultats obtenus sont les suivants:

- En présence de jus de viande qui contient l'antibiotique, nous avons remarqué qu'il y'a un virage de la couleur du milieu au niveau des deux tubes test :
  - ✓ Le virage du milieu inoculé et mélangé avec 100µl d'échantillon est immédiat (un virage vers le jaune bien nette)
  - ✓ Le virage du milieu inoculé auquel nous avons ajouté l'échantillon à la surface après solidification est tardif, après incubation (un virage vers le jaune bien nette).

Les résultats sont bien clairs dans la **figure 31**.

- Le résultat est identique même en augmentant la quantité du jus (200µl et 300µl). Le virage n'est donc pas du à une quantité insuffisante de l'antibiotique mais à l'acidité du jus de viande qui abaisse le pH du milieu ce qui donne un virage même sans incubation (un virage immédiat).
- Après la neutralisation du jus de viande, nous avons répété le même test précédent. Le résultat a donné un virage de la couleur mais après incubation. Il en est de même en augmentant la quantité de l'échantillon. Ce virage est donc probablement du au fait que le jus de viande est contaminé par des germes résistants aux antibiotiques qui peuvent se multiplier et abaissent le pH du milieu. Pour confirmer cela, nous avons réalisé un ensemencement d'une gélose nutritif par un jus de viande. Après incubation (30-37°C pendant 24h) notre suggestion est bien confirmée par l'apparaissions de colonies (**Figure.32**).

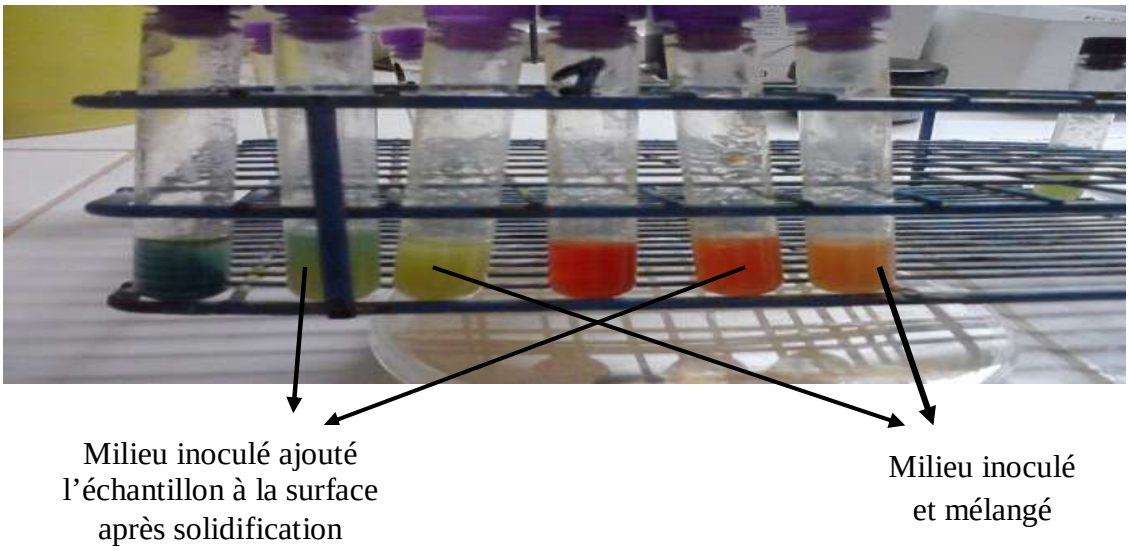


Figure 31: Résultat après incubation en présence de jus de viande.

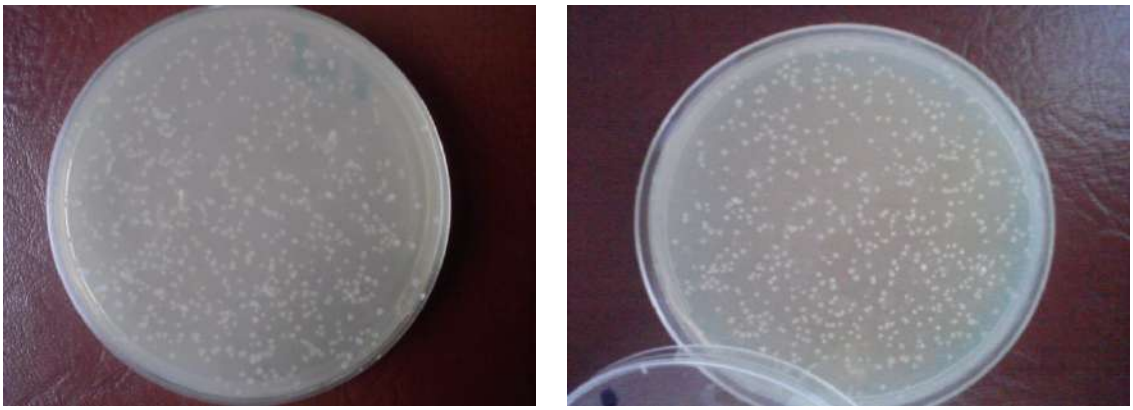


Figure 32 : Résultat après ensemencement du jus de viande.

- Il faut donc décontaminer le jus de viande de telle sorte à garder l'activité de son antibiotique. Pour cela, nous avons réalisé une filtration stérilisante manuelle du jus de viande avant son utilisation (petits filtres de 0.2 µm). Le test a été réalisé uniquement avec le milieu additionné de bleu de bromothymol (l'indicateur le plus sensible). Apres incubation (30-37°C pendant 24h), nous avons obtenu le résultat suivant (**Figure.33**):
  - Un virage de la couleur du milieu témoin (sans jus) du vert au jaune.
  - Nous n'avons pas obtenu un virage de la couleur du milieu en présence de jus de viande filtré à des volumes différents (100µl, 200µl et 300µl). Ceci explique bien l'effet inhibiteur de l'antibiotique présent au niveau de notre échantillon.

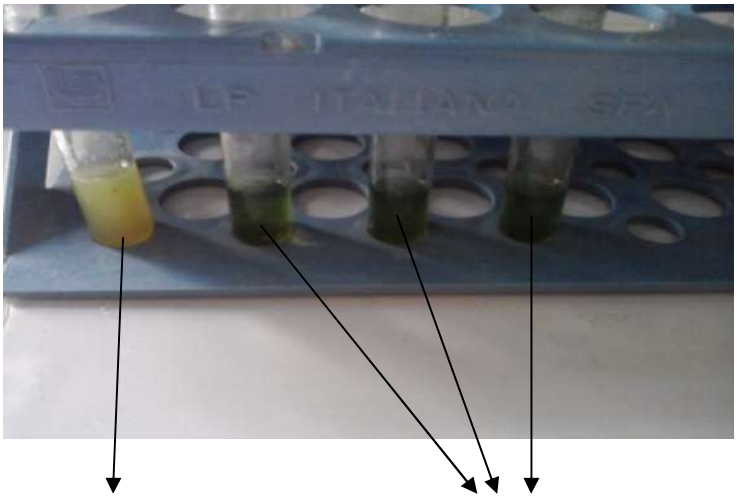


Figure 33 : Résultat après la filtration du jus de viande.

En conclusion, la méthode est très faisable sur milieu Mueller et Hinton, inoculé par *M. luteus* à une charge de 250 10^7 UFC/ml et additionné de Bleu de bromothymol. Il reste la condition essentielle qui est la filtration stérilisante de l'échantillon avant son utilisation. Il faut rappeler que le test nécessite un temps d'incubation de 10H au minimum. Le test est prometteur et nécessite une application sur un échantillonnage large afin de prouver son efficacité et sa sensibilité. Il nécessite aussi une amélioration de ses conditions de mise œuvre (durée d'incubation). En fin, nous jugeons aussi que l'usage des filtres stérilisant constitue une contrainte économique à discuter.

Pour cela, nous avons essayé un autre milieu : Mannitol mobilité qui peut exercer un effet de sélectivité métabolique sur la croissance des contaminants issus de la viande, car il contient le mannitol comme seul source de carbone et d'énergie.

b-Sur milieu mannitol mobilité :

Un test biochimique préliminaire de *M. luteus* a été réalisé sur le milieu mannitol mobilité afin de prouver le pouvoir de dégradation de cette souche vis-à-vis du mannitol. Le résultat obtenu est représenté sur la **figure 34**.

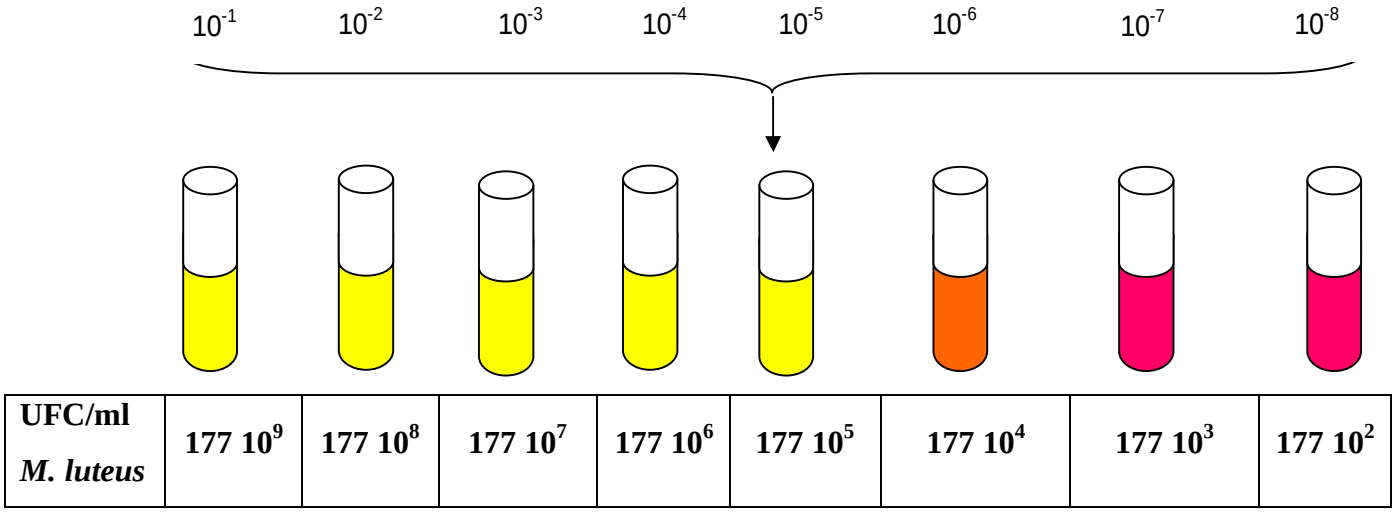


Figure 34 : Couleur du milieu Mannitol après incubation de *M. luteus*.

Le milieu est devenu jaune après incubation (à la surface et en profondeur). Ceci indique que *M. luteus* dégradent bien le mannitol (Mannitol+).

a- Optimisation de l'inoculum bactérien

En milieu solide, les résultats obtenus après incubation montrent un virage nette de la couleur du milieu jusqu'au tube ensemencé à partir de la dilution de 10^{-5} **(Figure.35)**. Donc nous pouvons tirer l'inoculum minimal qui induit un virage de la couleur du milieu qui est de 177.10^5 UFC/ml.



UFC/ml *M. luteus*	**177 10^9**	**177 10^8**	**177 10^7**	**177 10^6**	**177 10^5**	**177 10^4**	**177 10^3**	**177 10^2**

Figures 35: Optimisation de l'inoculum bactérien : Résultats obtenus après incubation des tubes (mannitol-mobilité) ensemencés à partir des différentes dilutions.

b- Test en présence d'échantillon contenant des antibiotiques

Il faut rappeler que cette étape a été réalisée uniquement pour les tubes ayant donné un virage de la couleur du milieu pendant le premier test. Cependant, nous nous intéressés surtout aux tubes qui contiennent l'inoculum minimal.

Après incubation des tubes additionnés de jus de viande d'un échantillon positif avec leurs témoins (sans jus) à 30-37°C pendant 24h, les résultats obtenus sont les suivants:

-Pour les témoins sans jus, nous avons constaté un virage de la couleur du rouge vermillon vers le jaune (du tube ensemencé à partir de la dilution 10^{-1} – 10^{-5})

-Pour les tubes additionnés de jus de viande, nous avons remarqué que le virage de la couleur se fait dans tous les tubes sauf les derniers tubes où nous avons constaté que la couleur rouge vermillon persiste à la surface supérieure du milieu. Ceci est expliqué par la mauvaise diffusion de l'antibiotique dans le milieu à cause de sa hauteur et la quantité de l'inoculum bactérien qui peut être incompatible (plus concentré) à la quantité d'antibiotique dans le jus de viande (100µl).

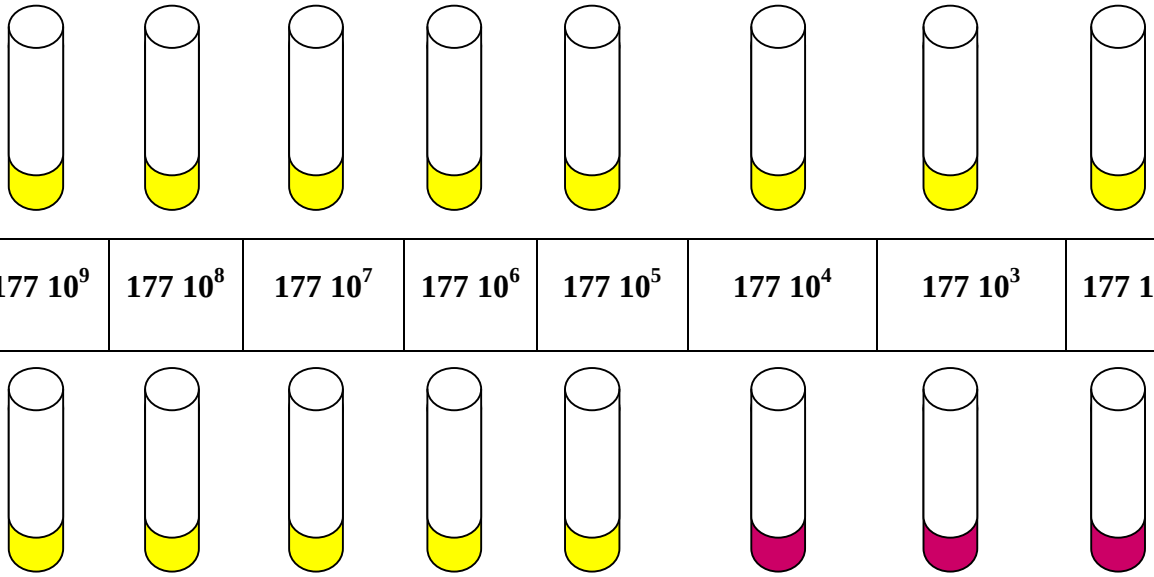
c- Optimisation de la hauteur du milieu

Les résultats obtenus après incubation des tubes sont (**Figure.36**):

✓ Les témoins ont viré du rouge vermillon au jaune pour les tubes ensemencés à partir de la dilution 10^{-1} jusqu'à la dilution 10^{-8} (**Figure.36**), ce qui correspond à un inoculum de 177 10^9 UFC/ml jusqu'à 177 10^2 UFC/ml. En réduisant la hauteur du milieu, nous avons remarqué que le virage du milieu persiste même à des inoculum très petits, inférieurs à la limite minimale déterminée auparavant (177 .10^5 UFC/ml) (section-a, **Figure.35**). Ceci peut être expliqué par la voie d'attaque du mannitol qui est à prédominance oxydative en présence d'une hauteur réduite. La voie oxydative acidifie le milieu rapidement et rend le virage du milieu plus sensible. Il faut signaler que nous n'avons pas testé d'inoculum plus petits (<177 10^2 UFC/ml) afin de limiter le nombre minimum à partir du quel la sensibilité de l'indicateur coloré est réduite.

✓ Pour les tubes additionnés de jus de viande, le virage de la couleur se fait jusqu'aux tubes ensemencés à partir de la dilution 10^{-5} (177 10^5 UFC/ml) (**Figure.36**). Au niveau des tubes ensemencés à partir des dilutions allant de 10^{-6}-10^{-8} (177 10^4 -177 10^2 UFC/ml), l'effet inhibiteur de l'antibiotique sur les souches apparait nettement ; car nous n'avons pas eu de virage de la couleur du milieu (**Figure.36**).

La méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques en milieu semi-solide (Mannitol mobilité) est donc faisable.



UFC/ml *M. luteus*	$177\ 10^9$	$177\ 10^8$	$177\ 10^7$	$177\ 10^6$	$177\ 10^5$	$177\ 10^4$	$177\ 10^3$	$177\ 10^2$

Figure 36 : Optimisation de la hauteur du milieu: Résultats obtenus après incubation des tubes contenant 0,25ml de milieu (mannitol-mobilité) ensemencés à partir des différentes dilutions.

Il reste donc de mieux explorer cette méthode en:

✓ Déterminant l'inoculum minimal au dessous duquel la sensibilité de l'indicateur coloré est réduite (sans et avec antibiotique).

✓ Optimisant le volume de l'échantillon,

✓ Optimisant plus amplement la hauteur du milieu,

✓ Le temps de contact avec l'échantillon à analyser,

✓ Le temps de réponse nécessaire à un virage qui doit être le plus court possible.

En fin pour pouvoir juger si les deux méthodes : en une seule boite et en tubes (Sur Mueller et Hinton et Mannitol mobilité) sont applicables, beaucoup de travaux restent à explorer concernant:

✓ La limite de détection des deux méthodes, afin de voir la possibilité de présence de faux positifs (en cas de souches très sensibles) et de faux négatifs (en cas de souches peu sensibles). Ceci nous permet de juger définitivement si notre souche est compatible aux dépistages des résidus d'antibiotiques au niveau des viandes.

✓ La reproductibilité et la répétabilité des deux méthodes,

✓ Une comparaison de ces méthodes avec :

- les méthodes officielles qualitatives sur un échantillonnage plus grand (dans le cas des méthodes en tubes),
- des méthodes quantitatives de référence (HPLC…).

La production des viandes en Algérie est importante et variée (poulet, ovin et bovin). 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 de méthodes microbiologiques (dépistage des résidus d'antibiotique) alternatives aux méthodes de références, sensibles et adaptées à nos moyens économiques.

Dans un premier volet de notre étude, nous avons analysé nos échantillons par deux méthodes microbiologiques officielles. Nous avons tiré les points suivant:

- Le taux global des échantillons positifs est de 22.10%,
- Parmi les échantillons de foie, 15% sont positifs, 32.2% des échantillons de muscle de poulet sont positifs et 26.6% des échantillons de bovin sont positifs.
- Pour tous les échantillons positifs (foie, muscle de poulet, bovin, ovin et caprin), les deux méthodes officielles de dépistage des antibiotiques convergent vers les mêmes résultats.
- Pour les échantillons de poulet, la famille des aminosides occupe le pourcentage le plus élevé d'utilisation (80%), suivie des quinolones (50%) puis les tétracyclines (40%) et finalement les sulfamides (20%). Les macrolides ne sont pas dépistés (0%).
- Pour les échantillons de bovin, la famille des aminosides et quinolones occupent le pourcentage le plus élevé d'utilisation (100%), suivies par les sulfamides (88%), les tétracyclines (38%) et en dernier les macrolides (0%).
- en élevage aviaire, les antibiotiques sont utilisés en association (50%), l'association à deux antibiotiques est prédominante (30%). Le pourcentage de l'association à quatre antibiotiques est de (20%).
- La contamination des viandes rouges bovines en résidus d'antibiotique est souvent liée à la présence de trois familles (75%), suivie par la contamination par quatre types d'antibiotiques (25%).

Dans un deuxième volet de notre travail, les échantillons ont été testés par deux nouvelles méthodes microbiologiques, dite méthodes alternatives (méthode en une seule boite et méthode en tubes). Cette étape est précédée par un test de la sensibilité des souches. L'antibiogramme révèle que *B. stearothermophilus, S. aureus, M. luteus* sont sensibles à plusieurs antibiotiques appartenant à toutes les familles.

Concernant la méthode d'une seule boite, nous avons obtenu les résultats suivants:

- Le milieu Mueller et Hinton est le plus favorable à la diffusion des antibiotiques à partir de leurs matrices,
- Sur Mueller et Hinton:
  - 15 échantillons ont été détectés comme positifs parmi 18 par *B. stearothermophilus,*
  - les résidus d'antibiotiques ont été dépistés sur 10 échantillons parmi 18 par *S. aureus*,
  - la souche la plus détectrice des résidus d'antibiotiques est *M. luteus*, puisque, cette souche a permis de détecter tous les échantillons positifs.
- Le dépistage des résidus d'antibiotiques par *M. luteus* sur Mueller et Hinton ne semble pas donner de faux positifs, puisque les échantillons négatifs, 3 échantillons douteux et 3 échantillons témoins négatifs obtenus par un élevage de poulet sans antibiotiques ont été détectés comme négatifs.
- La méthode du milieu solide en une seule boite est prometteuse à la détection des résidus d'antibiotiques en utilisant *M. luteus* comme souches multi-sensible et Mueller/Hinton comme milieu favorable. 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.

Concernant la méthode en tubes, nous avons utilisés deux milieux (Muller et Hinton, mannitol mobilité) et la souche : *M. luteus*. Nous avons démontré la faisabilité de ce test dans les conditions suivantes :

Sur Muller et Hinton :

- Un inoculum bactérien minimal de l'ordre de 260.10^7 UFC/ml avec le bleu de bromothymol comme indicateur coloré,

- Un volume du milieu Mueller et Hinton de 1ml,
- Un volume de jus de viande 100µl.
- Duré d'incubation (8h-10h).

Sur mannitol mobilité :

- Un inoculum bactérien maximal de l'ordre de 177 10^4 UFC/ml.
- Un volume du milieu mannitol mobilité de 0,25 ml (hauteur de 5mm),
- Un volume de jus de viande de 100µl,
- Une durée d'incubation de 24h.

Il reste donc de mieux métriser cette méthode en:

- Déterminant avec exactitude l'inoculum minimal au dessous duquel la sensibilité de l'indicateur coloré est réduite (surtout en cas du mannitol mobilité).
- Optimisant le volume de l'échantillon,
- Optimisant plus amplement la hauteur du milieu,
- Le temps de contact avec l'échantillon à analyser,
- Le temps de réponse nécessaire à un virage qui doit être le plus court possible.

En fin pour pouvoir juger si les deux méthodes alternatives proposées (en une seule boite et en tubes) sont applicables, beaucoup de travaux restent à explorer concernant:

✓ La limite de détection des deux méthodes, afin de voir la possibilité de présence de faux positifs (en cas de souches très sensibles) et de faux négatifs (en cas de souches peu sensibles). Ceci nous permet de juger définitivement si notre souche est réellement compatible aux dépistages des résidus d'antibiotiques au niveau des viandes.

✓ La reproductibilité et la répétabilité des deux méthodes,

✓ Une comparaison de ces méthodes avec :

- les méthodes officielles qualitatives sur un échantillonnage plus grand (surtout en cas des méthodes en tubes),
- des méthodes quantitatives de référence (HPLC…).

En conclusion, le citoyen algérien est réellement exposé aux résidus d'antibiotiques dans sa source protéique principale (poulet). Il est même le plus souvent exposé à une association de plusieurs résidus aux même temps. Une validation de méthodes, rapides et adéquates à nos moyens économiques deviens donc nécessité dans un futur proche