

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. MOULAY Taher » de Saida

Faculté des sciences

Département de biologie



Laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme du Master en biologie

Option : Microbiologie appliquée

Contribution à l'étude des résidus des antibiotiques dans le foie des volailles par la méthode de quatre boîtes

Présenter par : **M^{ELLE}. KADDOURI MALIKA**

M^{ELLE}. AMEUR AÏCHA

Soutenu publiquement, le 26-juin-2018 devant le jury composé de :

Mr. Kahloula Khaled	Professeur	Université de Saida	Président
Mr. Adli Djallal Eddine	Maître de conférences « A »	Université de Saida	Examineur
Mr. ZIANI Kaddour	Maître de conférences « B »	Université de Saida	Encadreur

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mr : (Ziani .k), son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mr :(kahloula.kh) et Mr : (Adli.D) pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous ne pourrions terminer, sans remercier tous les membres de laboratoire de biologie, tous ses qui ont participé d'une manière ou d'une autre dans l'élaboration de ce projet de fin d'étude.



Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à : A mes parents .Aucun hommage ne
pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler.*

Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce

projet :

A mes frères mes très chers sœurs ;

Sans oublié Ma tante et mes oncle ;

A mon fiancé

A ma binôme Micha qui a partagé avec moi ce laborieux; Je t'aime ma

cher.

A toute la famille Kaddouri ;

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit

possible, je vous dis merci.

Malika

Dédicaces

Je commence par rendre grâce à dieu et à sa bonté, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade.

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions.

Je dédie ce travail à

Mon cher père, ma chère maman qui ont veillé à ce que je suis arrivé maintenant.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

Mon frère Abderrahmane

Que dieu vous protège et vous offre une vie pleine de joie, bonheur et de réussite.

Toute ma famille, oncles et tantes.

Mes cousins et cousines.

Mes chers amies.

A ma binôme kika qui a partagé avec moi ce laborieux; Je t'aime ma cher.

Une dédicace particulière pour mes enseignants et mes collègues de la faculté des Science Biologique

Enfin, à tous ceux qui m'aiment.

Aïcha



Abstract

The broiler chicken meat must be above all a healthy product , that is to say free of pathogenic germs but also of drug residues and more especially of antibiotic residues. The present study was carried out with an aim of bringing up to date the existing data on the presence of the antibiotic residues in both raw and cooked broiler livers, by the standard method (four plates).

At the end of this study we have obtained different results between the same samples raw and cooked , These last were marked by the presence of residues(macrolides, aminosides et des β -lactamines). In the light of these results we can conclude that the meats coming from certain local breeding present a contamination by antibiotic residues What clearly imposes a biomonitoring of our food facing the real risk to public health.

Key words: Residues Antibiotics, Resistance, chicken liver, 4 plates method.

Résumé

La viande du 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. La présente étude a été réalisée dans le but d'actualiser les données existantes sur la présence des résidus d'antibiotiques dans les foies de poulet de chair à la fois crues et cuites, par la méthode normalisée (Quatre boites). À l'issue de cette étude nous avons obtenus des résultats différents entre les mêmes échantillons crus et cuits, ces dernières ont marqué par la présence des résidus (macrolides, aminosides et des β -lactamines). À la lumière des ces résultats nous pouvons conclure que les viandes provenant de certains élevages locaux présentent une contamination par des résidus d'antibiotique ce qui impose clairement une biosurveillance de nos aliments face aux ces risques réels à la santé publique.

Mots clés : Résidus d'antibiotiques, Antibiorésistance, Foie de poulet, Méthode de 4 boites.

المخلص

يجب أن يكون لحم الدواجن قبل كل شيء منتجاً صحياً، أي خالٍ من الجراثيم المسببة للأمراض ولكن أيضاً مخلفات الأدوية وبصورة خاصة بقايا المضادات الحيوية

أجريت هذه الدراسة لتحديث البيانات الموجودة عن وجود بقايا المضادات الحيوية في كل من كبد الدجاج اللامح الطازج و المطبوخ بالطريقة القياسية (أربعة علب)

في نهاية هذه الدراسة حصلنا على نتائج مختلفة بين نفس العينات النيئة والمطهية هذه الأخيرة قد تميزت بوجود بقايا

(macrolides, aminosides et des β -lactamines)

في ضوء هذه النتائج ، يمكننا أن نستنتج أن اللحم القادم من بعض التكاثرات المحلية يمثل تلوثاً بمخلفات المضادات الحيوية الذي يفرض بوضوح مراقبة بيولوجية على غذائنا أمام هذه المخاطر الحقيقية مع الصحة العامة

الكلمات المفتاحية بقايا المضادات الحيوية, المقاومة, كبد الدواجن, طريقة الأربع علب

Liste des Abréviations

ADH : Argénine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AFCs : Antibiotiques Facteurs de croissances

AK30: Amikacine

AMP10 : Ampicilline

API : Appareillage et procédé d'identification

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection.

ATCC: American Type Culture Collection.

AX: Amoxicilline

CASFM : Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DJA : Dose Journalière Admissible

E.coli : *Escherichia coli*

E15: Erythromycine

ELISA: Enzyme LinkedImmunoSorbentAssay

GMQ : Gain Moyen Quotidien

GN : Gentamycine

GN: Gélose Nutritive

Gram (-) : gram négative

Gram (+) : gram positive

GRAF : *Enterococcus faecium* Glycolipide- Résistants

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

H₂S : Sulfure d'hydrogène

IC : Indice de Consommation

IND : Production d'Indole

K30 : Kanamycine

LDC : Lysine Décarboxylase

LMR : Limite Maximale de Résidus

M.luteus: *micrococcus luteus*

min: minute

ml : millilitre

mm: millimeter

O₂ : Oxygène

ODC : Ornithine Décarboxylase

P. fluorescens : *Pseudomonas . fluorescens*

P. putida : *Pseudomonas. putida*

P. stutzeri : *Pseudomonas. Putida*

P10 : Pénicilline

PLP : Protéine Liant Pénicillines

RIA : Radio-ImmunoAssay

RRA : Radio- RecepteurAssay

S/I/R : Sensible/Intermédiaire/Résistant

S10: Streptomycine

SXT25: Trimethprime

TDA : Tryptophane Désaminase

TE30 : Tétracycline

TOB10: Tobramycine

TSI : Gélose-Glucose-Lactose-Saccharose

VP : Vogues Proskauer

Table de matière

Remerciements	I.
Dédicaces	II.
Abstract	IV.
Résumé	V.
ملخص	VI.
Liste des abréviations	VII.
Table des matières	VIII.
Liste des figures	IX.
Liste des tableaux	X.
Introduction	1

CHAPITRE 1 : Alimentation de volaille
--

1.1 Alimentation de poulet	3
1.2 Antibiotique dans l'alimentation	3
1.3 Actions des antibiotiques (facteur de croissance)	4
1.4 Antibiotiques utilisés en élevage avicole	6
1.5 Implication des antibiotiques facteurs de croissance dans l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques	7
1.6 Antibiotique facteur de croissance et réglementation	8
1.7 Conséquences de l'interdiction de l'utilisation des AFCs	9

CHAPITRE 2 : Antibiorésistance

2.1 Origine de l'antibiorésistance	12
1.2 Antibiotique dans l'alimentation	12
2.1.1 Résistance naturelle	13
2.1.2 Résistance acquise	13
2.2 Mécanismes de la résistance	14
2.3 Méthode de mesure de la résistance bactérienne	15
2.4 Conséquences de l'antibiorésistance	15
2.4.1 Conséquences sur la santé animale	15

CHAPITRE 3 : Résidus des antibiotiques

3.1 Risques présentes par les résidus	17
3.1.1 Risques pour la santé publique	17
3.1.1.1 Toxicité directe	17
3.1.1.2 Réactions allergiques	18
3.1.1.3 Acquisition d'antibiorésistance	18
3.1.1.4 Autres effets secondaires pour l'homme	18
3.1.1.5 Risques pour la santé animale	19
3.1.1.6 Risques d'ordre technologie	19
3.1.1.7 Risques pour l'environnement	19
3.1.2 Méthodes de détection et de quantification	20
3.1.2.1 Méthodes de détection (dépistage)	20
3.1.2.2 Méthodes de confirmation et de quantification	21
3.2 Limite Maximale de Résidus des antibiotiques	22
3.2.1 Fixation de la LMR	22
3.2.2 Délai d'attente	22
3.2.3 Fixation du temps d'attente	23
3.2.3.1 Modalité de détermination du temps d'attente	23
	23

CHAPITRE 4 : Matériel & Méthodes

4.1 Rappel sur les objectifs	25
4.2 Échantillonnage	25
4.3 Méthode d'analyse	25
4.3.1 Isolement et identification des souches bactériennes	25
4.3.1.1 Isolement	25
4.3.1.2 Identification	26
4.3.2 Antibiogramme des souches isolé	31
4.3.3 Méthode de quatre boîtes (NA2821, 1992)	32

CHAPITRE 5 : RESULTATS	
5.1 Examen Microscopique	36
5.2 Examen Macroscopique	37
5.3 Tests d'identification des isolats	38
5.4 Identification biochimique des différents isolats API20E	38
5.5 Antibiogramme de l'identification	39
5.6 Méthodes de quatre boites	40
5.6.1 Résultats des tests de confirmation	40
CHAPITRE 6 : Discussion	
	44
Conclusion	
	48
Références bibliographiques	
	50
Annexe	

Liste des figures

Figure 5.1 :	Principaux aspects macroscopiques sur Gélose nutritif.....	36
Figure 5.2 :	Principaux aspects macroscopiques sur Hectoen.....	36
Figure 5.3 :	Principaux aspects macroscopiques sur Chapman.....	36
Figure 5.4 :	Principaux aspects macroscopiques sur King B.....	36
Figure 5.5 :	Principaux aspects macroscopiques sur King A.....	37
Figure 5.6 :	Bactéries isolées à Gram +.....	37
Figure 5.7 :	Bactéries isolées à Gram -.....	37
Figure 5.8 :	Coloration de Gram des souches bactériennes testées.....	40
Figure 5.9 :	L'antibiogramme des souches bactériennes testées.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1.1 :	Liste des antibiotiques promoteurs de croissance autorisés comme additifs en Europe (Corpet, 1996)	10
Tableau 1.2 :	Autorisation de l'Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs dans l'alimentation animale aux Etats-Unis (AFSSA, 2006)	11
Tableau 3.1 :	Délai d'attente de quelques antibiotiques, (Milhaud, 1978)	23
Tableau 4.1 :	Les éléments de la description des colonies (BEZZALLA et GOUTTAYA, 2013)	26
Tableau 4.2 :	Codes des souches bactériennes de références utilisées	32
Tableau 4.3 :	les familles d'antibiotiques détectés par chaque type de boîte	35
Tableau 5.1	Résultats des tests biochimiques	38
Tableau 5.2 :	Résultats des tests de l'identification biochimique réalisée par API 20 ^e	38
Tableau 5.3 :	Diamètre critique des antibiotiques utilisés (CASFM, 2012)	39
Tableau 5.4 :	Résultats du test de la sensibilité des isolats aux antibiotiques	39
Tableau 5.5 :	Résultats d'antibiogramme de confirmation	42
Tableau 5.6 :	Zones d'inhibition obtenues pour les échantillons analysés avant cuisson	42
Tableau 5.7 :	Zones d'inhibition obtenues pour les échantillons analysés après cuisson	42

Introduction générale

En pratique d'élevage des poulets chair différents produits vétérinaires sont utilisés, sous la responsabilité ou non des vétérinaires dans le but de lutter contre les pathologies et améliorer le rendement (**Alambedji et al. 2008**). Parmi ces produits, les antibiotiques occupant une place indéniable. Néanmoins, leur utilisation sans contrôle peut conduire à la formation des résidus dans les produits issus de ces animaux, surtout lorsque les délais d'attente ne sont pas respectés par les utilisateurs. Ce qui conduit à un changement des caractéristiques organoleptiques et présentant un risque pour la consommation humaine.

La viande du 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. Leur présence entraînent l'émergence de résistances bactériennes à l'égard d'une grande partie des antibiotiques. Cette antibiorésistance constitue de nos jours une préoccupation sanitaire internationale, La résistance bactérienne est surtout observée lorsque les antibiotiques sont utilisés abondamment et que les bactéries peuvent se transmettre rapidement entre les individus. Ainsi l'utilisation intensive des antibiotiques dans un but thérapeutique, préventif ou comme stimulateur de croissance fait des élevages avicoles un lieu privilégié pour que des pathogènes résistants puissent apparaître, se développer et se propager (**kaci, 2014**).

Nous pouvons citer ici, des risques potentiellement liés à la présence des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale, par exemple: risques cancérigènes (Nitrofuranes), risques allergiques (Pénicillines, Streptomycine), risques toxiques (Chloramphénicol), modification de la flore intestinale (Tétracyclines), etc. (**Châtaigner et Stevens, 2005**)

Aujourd'hui, le prix de cette viande qui est relativement moins élevé que celui des viandes rouges, en fait un produit attractif pour la ménagère algérienne. Cependant, les contrôles des résidus de ces substances dans la denrée mise à la vente sont trop rares voire inexistantes ; d'où la nécessité de prévoir des dispositifs adéquats de détection et de quantification de ces résidus. L'analyse de cette denrée alimentaire

est donc nécessaire afin de garantir la maîtrise de la qualité (ou de la conformité) d'un point de vue sanitaire ou purement commercial (Zeghilet, 2009).

C'est pourquoi nous avons entrepris à la présente étude dont l'objectif principal est de détecter la présence de plusieurs familles des résidus d'antibiotiques dans des échantillons de foie de poulet de chair cuits (80°C pendant 45 minutes) et crus, en utilisant la méthode officielle des 4 boîtes, afin de construire une base de données sur l'utilisation de ces médicaments dans l'élevage avicole et donc évaluer le niveau de consommation de ces produits à risque.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Alimentation de volaille

1.1 Alimentation de poulet

L'aliment destiné à la volaille et généralement un mélange de matières premières de diverses origines et de composition chimique complexe. Il doit subir une série d'action physiques et chimiques préalables permettant d'obtenir des constituants simples absorbables appelés nutriments (**Larbier et Leclercq, 1992**). Les matières premières qui composent l'aliment de poulet ont une origine végétale qui comprend en générale les sous-produits des céréales, le maïs et sous-produits, les tourteaux des graines oléagineuses. L'aliment est composé aussi des additifs : vitamines, minéraux, antioxydant, anticoccidien et autres produits médicamenteux incorporé selon le cas.

Le cycle de l'élevage de poulet de chair est divisé en trois périodes : période de démarrage, qui dure environ 20 jours, l'aliment doit contenir une teneur en protéines brutes entre 21-23%. Ce cycle est suivi par une période croissance qui peut durer jusqu'aux 45 jours, suivi par le cycle de finition jusqu'aux 54 jours, date de l'abattage ou le retrait.

1.2 Antibiotique dans l'alimentation

Les antibiotiques sont des substances antibactériennes d'origine biologique, (produite par des micro-organismes), ou de synthèse chimique (capable d'inhiber la vitalité d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux de germe (**Lechat, 2008**). Cette définition implique une origine strictement naturelle des antibiotiques : la majorité des antibiotiques sont en effet produits par les moisissures (champignons inférieurs). Elle exclut donc les composés artificiels de synthèse ; néanmoins, si au départ, tous les antibiotiques sont des substances naturelles, de nombreux « dérivés semi-synthétique » ont été obtenus par modification des composés initiaux. D'après cette définition, l'action d'un antibiotique peut :

- Soit inhiber la croissance, la multiplication des bactéries : effet bactériostatique ;
- Soit de détruire les bactéries : effet bactéricide (**Fontaine M,1992**).

Une substance antibactérienne capable d'atteindre seulement un petit nombre ou bien de très nombreuses espèces bactériennes, on parlera donc d'un antibiotique à spectre étroit (Ex. pénicillines G) ou bien à spectre large (ex. tétracycline) (**Lullmann et al,2001**).

1.3 Actions des antibiotiques (facteur de croissance)

Après la naissance la flore intestinale des animaux se développe, des micro-organismes proviennent de la mère et de l'environnement 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 en bas bruit, cela affecte les performances zootechniques des animaux(**Corpet, 1999**)

Les antibiotiques exercent leur action sur la flore endogène et d'opportunité. Par ce biais, les facteurs de croissance permettent d'amoindrir les effets négatifs dus aux déséquilibres rencontrés lors de certaines périodes critiques de l'élevage ou dus à leurs conditions de vie insalubres. À 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 au plan nutritionnel et environnemental sont marqués par une 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) ; aussi par une 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(Deviet al, 2006).

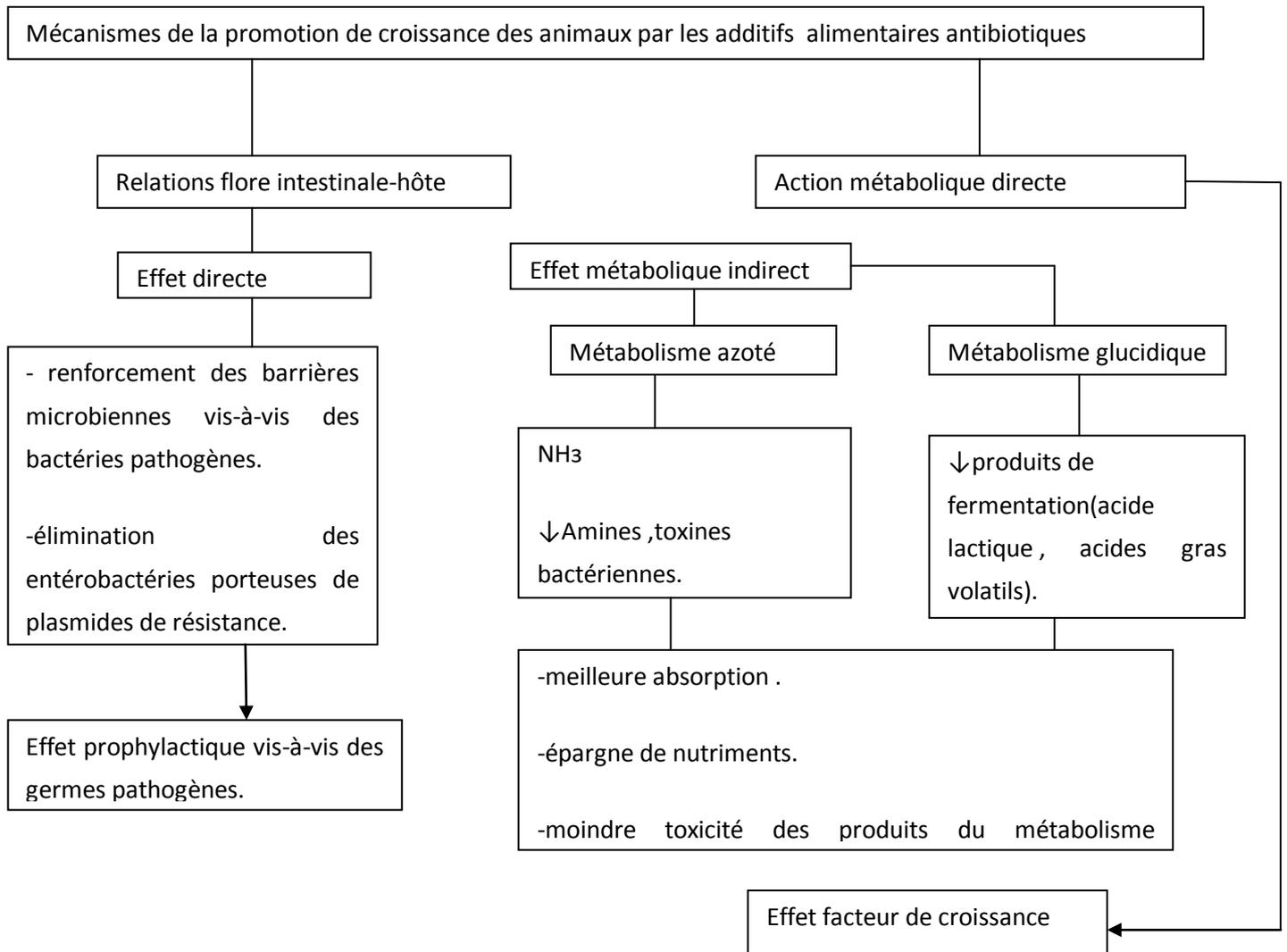


Figure 1.1 : Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques, (Frayssse et Darré, 1990).

1.4 Antibiotiques utilisés en élevage avicole

Les promoteurs de croissance sont des antibiotiques qui, administrés à faibles doses dans l'alimentation animale ont un effet préventif sur certaines infections bactériennes et modifient la composition du microbiote intestinal entraînant une meilleure assimilation des aliments par les animaux. Ces effets protecteurs entraînent un effet zootechnique sous forme d'une augmentation de la vitesse de Croissance (**Sanders P, 2005**). Par souci de protection du consommateur, les instances européennes responsables de l'autorisation de mise sur le marché des additifs destinés à l'alimentation animale ont considéré que le bénéfice zootechnique ne justifiait pas cette utilisation. En effet, il existe un risque de sélection de bactéries résistantes pouvant avoir un effet désastreux sur la santé publique. Cependant aux États-Unis, un grand nombre d'antibiotiques reste autorisé à faible dose comme facteurs de croissance (**Sanders P, 2005**)

Le mode d'action des antibiotiques comme facteurs de croissance n'est pas encore précisément connu à ce jour. Ils affecteraient l'activité métabolique de certains microorganismes intestinaux, ou entraîneraient un changement de l'équilibre de l'écosystème intestinale (**Samanidou et Evaggelopoulou, 2008**). Cette hypothèse repose sur le fait que la microflore intestinale aurait un impact négatif sur la croissance animale, directement ou indirectement, et que le mécanisme des Antibiotiques facteurs de croissance (AFCs) dépendrait leurs propriétés antibactériennes.

De plus, le fait que les AFCs n'aient pas d'effet chez des poulets axéniques conforte cette idée (**Collier et al., 2003**). Ont également montré en 2003 que des traitements aux AFCs entraînaient une réduction de la diversité des espèces ainsi qu'une réduction du nombre total de bactéries de la microflore intestinale de porcs castrés.

1.5 Implication des antibiotiques facteurs de croissance dans l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques

Malgré tous les avantages apportés par les AFCs à l'industrie de production animale, en termes de santé, mais aussi d'économie, une conséquence inquiétante de l'utilisation de ces produits est apparue, dès les années 1950. En effet, les AFCs sont proches de ou identiques aux antibiotiques utilisés en médecine humaine, comme les β -lactames, les tétracyclines, les sulfonamides, les macrolides, les lincosamides et les quinolones (**Samanidou et Evaggelopoulou, 2008**). Il est reconnu et établi que l'utilisation d'antibiotiques, à but thérapeutique, prophylactique ou en tant qu'additifs alimentaires, dans les différents écosystèmes (animaux, hommes) a conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes, par élimination des souches sensibles (**Davies, 1994**). Ces souches résistantes apparaissent suite à des mutations dans leur ADN, leur conférant un gène de résistance.

L'émergence de ces résistances est observée quel que soit l'antibiotique utilisé et quels que soient le mécanisme biochimique et le support génétique de la résistance (**Bories et Louisot, 1998**). Le transfert de ces résistances, des bactéries commensales ou bactéries pathogènes entraîne alors un problème sanitaire important. Bien que les antibiotiques utilisés en tant qu'additifs aient un pouvoir sélectionnant faible comparativement à certains antibiotiques utilisés en thérapeutique, il est prouvé que des réservoirs de résistance se constituent là où les antibiotiques sont utilisés en quantité importante et/ou en quantité plus faible mais de façon prolongée.

L'apparition de résistance bactérienne due à un AFC a été rapportée pour plusieurs autres antibiotiques : les macrolides (tyrosine and spiramycine), l'avilamycine, la virginiamycine et la bacitracine (**Aarestrup et al., 2000**). Un exemple a été étudié plus en détail, celui des *Enterococcus faecium* glycolipide-résistants (GREF). Ces GREF ont tout d'abord été isolés dans les fèces de porcs et de poulets issus d'élevages utilisant de l'avoparcine, alors que l'espèce résistante n'était pas ou peu présente dans les élevages n'utilisant pas cet AFC (**Klare et al., 1995b**). Cette observation a démontré que l'utilisation de l'avoparcine (de type glycolipide) en tant qu'additif alimentaire entraîne la création d'un réservoir de GREF dans les élevages.

De plus, la présence de GREF dans les carcasses de volailles et dans la viande de porc a démontré la possibilité de contamination des viandes à destination de l'alimentation humaine (**Chadwick et al., 1996**). La transmission des GREF résistants aux humains a été confirmée (**Schouten et Voss, 1997**). Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres AFCs comme la virginiamycine avec les Entérocoque (**Werner et al., 2000**), ou la bacitracine avec les Streptocoques, les Entérocoques et les staphylocoques (**Everett et al., 1995**). Ces études démontrent bien toute l'importance de contrôler l'apparition de résistances bactériennes chez l'animale afin de limiter ensuite le transfert de ces résistances chez l'homme (**Witte et al, 1999**).

1.6 Antibiotique facteur de croissance et réglementation

Quoique l'association entre la résistance bactérienne et l'apport d'antibiotiques facteurs de croissance chez les poulets a été rapportée par Barnes en 1958 et Elliott et Barnes en 1959, la prise de conscience de l'impact du développement de résistances chez les pathogènes de l'homme a eu lieu des 1969 grâce au rapport de Swann au parlement britannique (**Swann-committee, 1969**). Ce rapport proposait des recommandations pour l'utilisation des AFCs afin de limiter les risques pour l'homme. L'utilisation des AFCs a ainsi été restreinte aux antibiotiques entraînant un impact économique significatif dans les élevages : n'ayant pas ou peu d'application comme agents thérapeutiques. Chez l'homme comme chez l'animal et n'affaiblissant pas l'efficacité des médicaments thérapeutiques via le développement de souches résistantes (**Butaye et al., 2003**).

Ces critères furent ensuite repris par l'Union Européenne pour les protocoles d'obtention des autorisations de commercialisation des AFCs (**Helmut et Bulling, 1985**). Ainsi, les antibiotiques à large spectre n'ont plus été utilisés à partir des années 1970, seuls les AFCs ayant un spectre d'activité envers les bactéries Gram-positives étaient autorisés. La totalité des AFC n'a pas été interdite à ce moment-là car le possible transfert à l'homme des germes résistants à ces produits n'était pas démontré. La Suède avait cependant interdit l'utilisation de tout antibiotique comme additif alimentaire dans l'alimentation humaine ou animale des 1986. La position politique européenne a changé lors de la découverte du transfert des (GREF) en 1993. Depuis cette date, un grand nombre d'interdictions, nationales ou européennes ont été mises en place. L'Avoparcine a été interdite au Danemark (1995) et en Allemagne

(1996). La Spiramycine a été interdite en Finlande et la Virginiamycine au Danemark (1998). À la suite de ces initiatives nationales, la directive européenne 97/6 annula l'autorisation d'utilisation de l'Avoparcine en 1997 et la directive 2821/1998 interdit la Spiromycine, la Virginiamycine et la Bacitracine en 1999. Début 2006, la totalité des antibiotiques fut interdite en Europe pour l'utilisation en tant qu'additif alimentaire par la loi 1831/2003 (**The-European-parliament-and-the-council,2003**). Leur utilisation étant alors réservée à un usage thérapeutique.

1.7 Conséquences de l'interdiction de l'utilisation des AFCs

Les conséquences de l'interdiction de l'utilisation des AFCs a certes entraîné une intensification de l'utilisation des antibiotiques à usage thérapeutique consécutive à l'accroissement des infections chez l'animal, mais a tout de même favorisé la diminution de l'usage global (**Casewell et al., 2003**). Toutefois, les avis des scientifiques sur les conséquences de cette interdiction qui sont de deux ordres, sont mitigés (**Philips, 2007**).

Tableau1.1 :Liste des antibiotiques promoteurs de croissance autorisés comme additifs en Europe (**Corpet, 1996**).

Molécule	Groupe chimique	Mode d'action Molécule Groupe	Spectre
Avoparcine*	Glycopeptide	Paroi	Gram +
Bacitracine -Zinc *	Polypeptide	Paroi	Gram +
Flavophospholipole	Glycophospholipide	Paroi	Gram +
Avilamycine	Orthosomycine		Gram +
Salinomycine	Polyether ionophore		Gram+ coccidiostatique
Monensin	Polyether ionophore		Gram+ coccidiostatique
Spiramycine *	Macrolide	Synthèse protéique	Gram +
Tylosine*	Macrolide	Synthèse protéique	Gram +
Virginiamycine *		Synthèse protéique	Gram +

Tableau 1.2: Autorisation de l'Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs dans l'alimentation animale aux Etats-Unis (AFSSA, 2006).

	Utilisation USA	Analogue en médecine humaine
Avilamycine	non	aucun
Avoparcine	non	glycopeptides
Bacitracine	oui	bacitracine
Bambermycine	oui	aucun
Carbadox	oui	aucun
Erythromycine	oui	MLS
Lincomycine	oui	MLS
Monensin	oui	aucun
Olaquinox	non	aucun
Pénicilline	oui	β -lactamines
Salinomycine	non	aucun
Spiramycine	non	MLS
Tétracycline	oui	tétracycline
Tiamuline	oui	aucun
Tylosine	oui	MLS
Virginiamycine	oui	MLS

Chapitre 2

Antibiorésistance

Une définition consensuelle de Ferron (1994) reprend les différentes priorités mises en avant par les chercheurs, scientifiques et praticiens. Cette définition indique « qu'une bactérie est résistante à un antibiotique lorsqu'elle supporte des concentrations inhibitrices de cet antibiotique supérieures aux concentrations que l'on peut obtenir dans l'organisme sans atteindre les doses toxiques ». (Ferron, 1994).

Les différents points de vue influencent donc les aspirations à la lutte contre l'antibiorésistance de même qu'une définition commune peut aider à ce que la majorité des acteurs se sente concernée.

C'est en comparant un ensemble de gènes vieux de 30 000 ans codant des résistances aux bêta-lactamases, aux tétracyclines et aux antibiotiques glycopeptidiques avec des gènes plus récents que des chercheurs ont pu mettre en évidence la similarité, la complexité et l'ancienneté des origines de ces mécanismes de résistances (D'Costa *et al.*, 2011).

2.2 Origine de l'antibiorésistance

L'antibiorésistance est donc une réponse physiologique de la bactérie à tout usage d'antibiotique, réponse liée à des « gènes de résistance » qui existaient bien avant la découverte et l'utilisation des antibiotiques (AFSSA, 2006). Cette réponse peut être naturelle ou acquise au cours du temps.

2.2.1 Résistance naturelle

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques. Cette résistance est innée ou naturelle. Leur patrimoine génétique leur permet de se défendre grâce à plusieurs techniques. La résistance peut être due à la structure de la bactérie (par exemple, les mycoplasmes par leur absence de paroi sont insensibles aux bêta-lactamines) ou à l'impossibilité pour l'antibiotique de pénétrer dans la

cellule (les bactéries gram négatives grâce à leur membrane externe sont insensibles à la vancomycine). Ces résistances sont retrouvées dans l'ensemble des souches d'une même famille d'antibiotiques et représentent donc le spectre d'activité naturel des familles et sous-familles d'antibiotiques (Guerin-Fauble, 2010).

2.2.2 Résistance acquise

Plus inquiétante, la résistance acquise entraîne la résistance à un ou plusieurs antibiotiques aux quels la bactérie était sensible auparavant. Cette résistance peut survenir via une mutation (directement sur le chromosome bactérien) ou plus fréquemment par acquisition de matériel génétique mobile (plasmide, transposon, etc.) permettant dans les deux cas de contourner l'effet délétère de l'antibiotique (Guerin-Fauble, 2010).

En général, les mutations permettent aux bactéries de se doter d'une résistance à un antibiotique ou une famille d'antibiotique, alors que, via un plasmide, elles peuvent acquérir simultanément une résistance pour plusieurs antibiotiques ou plusieurs familles d'antibiotiques.

Dans toute population bactérienne, il existe une faible fraction de germes (1%) ayant une tolérance phénotypique aux antibiotiques. Cette résistance adaptative est due à un phénomène épigénétique. Ces germes particuliers sont appelés « *Persisters* » ou « *dormants* ». Il a été démontré que ces cellules jouent un rôle dans le caractère récalcitrant des bio films aux antibiotiques et de la difficulté à traiter certaines maladies chroniques comme la tuberculose (Keren *et al.* 2004).

2.3 Mécanismes de la résistance

Quel que soit le support génétique de la résistance, elle s'exprime au niveau cellulaire par différents mécanismes biochimiques dont les plus importants sont:

- *Inactivation de l'antibiotique*

Ce mécanisme de résistance est d'une importance pratique considérable car il touche des antibiotiques très utilisés en thérapeutique. Certains antibiotiques sont détruits par des enzymes sécrétées par les bactéries avant même d'avoir eu le temps

de parvenir à leur site d'action. C'est le principal mécanisme de résistance des bactéries aux β -lactamines, aminosides, et chloramphénicol (Tancrede, 1983).

- *Diminution de la pénétration*

Les antibiotiques pénètrent à l'intérieur de la bactérie grâce à des protéines qui se trouvent à la surface de la bactérie et appelées porines. Une modification de la structure de ces porines bloque le passage des antibiotiques. C'est le principal mécanisme de résistance aux tétracyclines (Tancrede, 1983).

- *Modification ou substitution du site de l'antibiotique :*

Les antibiotiques agissent de façon spécifique en se fixant sur certains sites cellulaires. Une faible modification structurale de ces sites peut diminuer ou supprimer l'affinité de certains antibiotiques pour leurs récepteurs bactériens. C'est le cas de la résistance de certaines bactéries aux macrolides, sulfamides, aminocyclitols. Il existe des réservoirs de bactéries résistantes, de plasmides et de gènes de résistance dont la circulation souvent méconnue contribue au maintien et à l'évolution de l'antibiorésistance (Tancrede, 1983).

2.4 Méthode de mesure de la résistance bactérienne

Pour mesurer microbiologiquement la résistance d'une bactérie, la notion communément utilisée dans le monde scientifique est la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI représente la première concentration en antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée. La mesure de la CMI est souvent accompagnée de la mesure de la concentration minimale bactéricide (CMB). Elle correspond à la concentration permettant de réduire la population bactérienne d'un facteur 1000. Les mesures de CMI et CMB sont dépendantes des conditions de cultures de la bactérie. Les conditions de déterminations de ces indicateurs ont donc été calibrées et standardisées. Ensuite, des antibiogrammes peuvent être réalisés. Leur interprétation repose sur l'évaluation de la CMI en fonction du diamètre d'inhibition. Ces outils permettent de prédire la sensibilité des bactéries aux

antibiotiques en matière d'efficacité clinique. Ainsi, une souche pathogène peut être catégorisée cliniquement de sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R).

L'antibiogramme sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne, et peut orienter l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles (Julie, 2014).

2.5 Conséquences de l'antibiorésistance

La fréquence de l'antibiorésistance aussi bien parmi les germes pathogènes que saprophytes, qui constituent les flores de l'animal, pose des problèmes thérapeutiques et hygiéniques.

2.5.1 Conséquences sur la santé animale

La résistance chez les agents pathogènes des animaux varie grandement de 0 à 90% selon l'antibiotique testé, les espèces hôtes de l'animal et l'emplacement géographique. L'antibiorésistance est une préoccupation pour la santé animale, lorsque les antibiotiques perdent leur efficacité pour le traitement ou la prophylaxie des infections bactériennes, entraînant ainsi une morbidité et une mortalité accrues chez les animaux. Ceci conduit à l'utilisation de médicaments plus coûteux, augmentant les coûts de soins de santé des animaux (Jouyet al, 2002).

2.5.2 Conséquences sur la santé humaine

Au fil des années, on a observé une augmentation de la fréquence d'isolement de bactéries multirésistantes en médecine humaine. La résistance des bactéries des animaux destinés à l'alimentation peut se transmettre aux humains par la chaîne alimentaire, par l'eau, ou par contact avec des animaux (Jouyet al, 2002). Ceci met en cause l'usage d'antibiotiques chez les animaux d'élevage, mais il faut mesurer la part de responsabilité de l'antibiothérapie humaine. L'introduction permanente de souches en milieu hospitalier, par le biais de patients admis porteurs, quelle que soit

l'origine de leur portage, ainsi que par le biais de la nourriture, a pour conséquence une possible dissémination ultérieure des souches dans l'hôpital (AFSSA, 2000).

Chapitre 3

Résidus des antibiotiques

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux antibiotiques reçus par (STOLTZ, 2008). La définition de résidus est codifiée dans une directive européenne (directive 81/851/ CEE, 1981). Dans cette directive, les résidus sont définis comme étant : « tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré ».

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

3.1 Risques présentes par les résidus

Les risques présentés par les résidus suite à leur utilisation chez les animaux sont de quatre ordres (Scippo, 2008) : risques pour la santé publique ; risques pour la santé animale ; risques pour l'environnement et des risques d'ordre technologique.

3.1.1 Risques pour la santé publique

3.1.1.1 Toxicité directe

Les antibiotiques dont l'utilisation est actuellement interdite et qui présentent plus de toxicité sont le chloramphénicol et nitrofurannes, ces derniers sont soupçonnés d'être responsable de foeto-toxicité.

Certains sulfamides sont foeto-toxiques à forte dose. Ces molécules passent dans le lait maternel, et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un mois. Ils ont des effets néfastes sur le matériel génétique et notamment l'ADN, sur la reproduction, la

fertilité, et une toxicité pour le système nerveux, et le système immunitaire, (Châtaigner et Stevens, 2005)

3.1.1.2 Réactions allergiques

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des Bêtalactames. Quant aux macrolides, ils causent peu d'effets secondaires et seulement très peu d'entre eux semblent causés par des mécanismes allergiques. Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotique administrées lors 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).

3.1.1.3 Acquisition d'antibiorésistance

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 antibiorésistances apparues chez les humains. Des chercheurs étudient cependant la possibilité qu'un tel lien puisse exister (Klotins, 2006).

3.1.1.4 Autres effets secondaires pour l'homme

Les autres effets dus aux résidus sont d'ordre toxicologique et pharmacologique, possédant une influence sur la flore humaine citons par exemple : une modification de sa composition par inhibition sélective et une sélection des microorganismes résistants. Cependant, il n'y a pas des preuves scientifiques que des concentrations en résidus inférieures aux limite maximale de résidus (LMR) puissent modifier sérieusement la flore intestinale, (Scippo, 2008). Des études in vivo sur des modèles animaux visant à évaluer les effets de doses thérapeutiques et de résidus de

tétracyclines sur la flore intestinale humaines ont mis en évidence les modifications engendrées sur la flore intestinale. Il y a eu une sélection de bactéries résistantes à la tétracycline, ainsi qu'un effet sur les populations fécales aérobies et anaérobies, sans compter les modifications de certains paramètres métaboliques de la microflore. Un effet cancérigène, est n'est pas négligeable, une ingestion répétée et prolongée de ces produits peut induire le développement de tumeurs cancéreuses (**Châtaigner et Stevens, 2005**).

3.1.1.5 Risques pour la santé animale

Les antibiotiques utilisés en thérapeutiques possèdent en règle générale une faible toxicité. Ceci les différencie des antiseptiques externes qui ne peuvent en aucun cas être employés par voie générale. Néanmoins, certains antibiotiques présentent une forte toxicité générale qui empêche leur emploi dans beaucoup d'espèces animales. C'est le cas des antibiotiques ionophores 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 2 types d'effets indésirables, une perturbation de la flore digestive et des échecs thérapeutiques par sélection de résistance (**Puyt et Guérin-Faublée, 2006**).

3.1.1.6 Risques d'ordre technologique

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

3.1.1.7 Risques pour l'environnement

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

action sur la flore commensale, d'autant plus que les antibiotiques excrétés sont à doses inférieures aux Concentration Minimale Inhibitrice (Chatellet, 2007).

L'administration d'un antibiotique peut avoir des conséquences indirectes sur l'environnement. Les mutants peuvent contaminer les denrées alimentaires. De plus; un animal peut se contaminer en s'abreuvant aux eaux de surface. Aussi les bactéries d'origine fécale sont épanchées avec le fumier, et par conjugaison peuvent transmettre leurs éventuels gènes de résistance aux bactéries de sol. L'utilisation des antibiotiques en élevage représente donc un risque de sélection de résistance chez les bactéries environnementales (Chatellet, 2007).

3.1.2 Méthodes de détection et de quantification

Le contrôle des résidus des antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale s'effectue en 2 étapes avec la recherche d'un effet antibactérien par une méthode de dépistage et de confirmation de la présence d'un antibiotique par une méthode physico-chimique (Guillemot, 2006).

3.1.2.1 Méthodes de détection (dépistage)

Sont rapides et peu coûteuses, permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. Elles doivent avoir des limites de détection suffisamment basses, (Scippo et Maghuin, 2006).

a. Méthodes de détection biologique (Microbiologique)

i. Méthode alternative (Premi®Test)

Permet de détecter les résidus des antibiotiques présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins le poisson et les œufs. C'est un test à large spectre, qui détecte un grand nombre d'ATB couramment utilisés pour la viande (Eloit, 2004).

ii. Méthode de référence (méthode de 4 boîtes)

A pour objectif et à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibactérienne sans déterminer leur identité. Elle est

applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras (Gaudin et al, 2006)

b. Méthodes biochimiques

i. Méthode enzymatique (Penzym®Test)

Ce test qui sert pour la détection des résidus des antibiotiques de type bêta-lactamines (test qualitatif) dans le lait a été adapté à la mise en évidence de ces résidus dans la viande toute en tirant parti de la propriété de l'hydroxylapatite d'adsorber les protéines à faible force ionique et à pH neutre (Danhaive, 1986).

ii. Méthode sur Tigettes (Test beta star)

C'est un test de type Récepteur-Assay. Il est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Il est très spécifique de bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines)(Scippo, 2008).

c. Méthodes immunologiques

i. RIA (Radio-ImmunoAssay) et RRA (Radio- RecepteurAssay)

Il est basé sur la compétition qui existe entre l'antibiotique marqué par un isotope et ce même antibiotique non marqué présent dans l'échantillon à doser, pour un récepteur bactérien. (Brouillet, 2002).

ii. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Se base sur le même principe que le RIA mise à part le fait que le marquage est enzymatique au lieu d'être radioactif (Maghuin-Rogister et al, 2001).

3.1.2.2 Méthodes de confirmation et de quantification

a. Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de 2 phases, l'une stationnaire et l'autre mobile (Chaboun, 2008).

b. Méthode spectrométrique (spectrométrie de masse (SM))

C'est une méthode physico-chimique permettant d'identifier un principe toxique. Elle mesure des rapports masse/charge de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations (Haffmann et al, 2005).

3.2 Limite Maximale de Résidus des antibiotiques

Une LMR est la concentration maximale de résidus qui peut demeurer dans les tissus ou les produits alimentaires issus d'un animal destiné à l'alimentation humaine à qui l'on a administré des médicaments vétérinaires et que le consommateur et sans effet sur les processus de fabrication (Fabre et al, 2006).

3.2.1 Fixation de la LMR

La notion de LMR constitue une synthèse entre les attentes des consommateurs et les contraintes des producteurs permettant, sans interdire l'utilisation des médicaments, leur utilisation en toute sécurité. Cette LMR est calculée en prenant en compte le risque toxicologique et l'effet potentiel des résidus sur la flore digestive d'homme. Selon Fabre et al (2006) la fixation de la LMR s'appuie sur 3 notions essentielles :

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

3.2.2 Délai d'attente

Le temps d'attente d'un médicament est le « délai à observer entre l'administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et

l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal, garantissant qu'elles ne contiennent pas de résidus pouvant présenter des dangers pour le consommateur» (Milhaud, 1978).

Tableau 3.1 : Délai d'attente de quelques antibiotiques, (Milhaud, 1978).

Antibiotique	Animaux deboucherie	Animauxlaitiers	Volailles pondeuses(œufs)
Oxytétracycline	2 semaines	1 semaine	
Spiramycine	3 semaines	3 semaines	3 jours (Voie orale) 3 semaines (autres voies)
Oléandomycine	Voie orale 5jours	5 jours	
Tylosine	3 semaines	3 semaines	3 jours (Voie orale) 2semaines (formesinjectables)
Polymyxine B	Voie orale 3jours Autres voies 1mois		

3.2.3 Fixation du temps d'attente

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

3.2.3.1 Modalité de détermination du temps d'attente

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

c. Méthode classique

Consiste à fixer comme temps d'attente, le délai nécessaire pour que tous les tissus, de tous les animaux d'essai, présentent une teneur en résidus inférieure à la

LMR fixée pour chacun d'eux. Ce délai de sécurité peut être estimé à 10 à 30% du délai précité, ou 1 à 3 fois la demi-vie d'élimination, en tout cas au moins 1 à 2 jours, (Milhaud et Pinault, 1999).

d. Nouvelle approche

Elle utilise une approche statistique se basant sur des principes de pharmacocinétique bien établis. Elle considère que l'élimination des résidus correspond à un modèle cinétique mono-compartmental, la décroissance des concentrations en fonction du temps d'attente par une analyse de régression linéaire du log de la concentration en fonction du temps (Milhaud et Pinault, 1999).

PARTIE

EXPERIMENTALE

Chapitre 4

Matériel & Méthodes

4.1 Rappel sur les objectifs

Notre étude a consisté de faire l'isolement et l'identification des certaines bactéries existant dans le foie de poulet de chair, ensuite nous avons recherché la présence des résidus des antibiotiques dans ces matrices par l'utilisation de la méthode de quatre boites sur des échantillons cuits (80°C pendant 45 minutes) et crus.

4.2 Échantillonnage

Dans notre étude, les échantillons sont représentés par les foies de poulet de chair. Échantillonnage faite directement au hasard après l'achat des abats (sept échantillons de foie) au niveau du marché de la ville de Saida. Nos échantillons sont emballés dans des barquettes, ont été analysés dans les premières heures d'échantillonnage. Les prélèvements sont prélevés à partir du foie dans une zone stérile à l'aide d'une lame bistouri et par un écouvillon stérile au profond de foie (Noussaira & Chanoine, 2006).

4.3 Méthode d'analyse

4.3.1 Isolement et identification des souches bactériennes

4.3.1.1 Isolement

L'isolement a été réalisé Dans des conditions d'asepsie, 5ml d'eau physiologie (0,9% Na Cl) a été ajouté dans le tube d'écouvillon, puis agiter à l'aide d'un vortex (inoculum). Pour enlever le liquide excédentaire, l'écouvillon est tourné, ensuite l'ensemencement sur les milieux des cultures suivantes : gélose nutritif (GN), Chapman, Hektoen, King A, King B, dans l'objectif d'avoir plusieurs souches bactériennes. L'ensemencement doit se faire dans les 15min qui suit la préparation

de l'inoculum sur le milieu correspond, Après fait l'Incubation à 37°C pendant 18 à 24 H.

4.3.1.2 Identification

L'identification des isolats a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par **Gusilset al. (2010)**.

a. Identification Macroscopique

Les éléments de la description des colonies sont représentés dans **le tableau 4.1**

Tableau 4.1 : Les éléments de la description des colonies (**BEZZALLA et GOUTTAYA, 2013**)

Aspect	Description
La taille	Mesurée à l'aide d'une règle gradué pour les grandes colonies
La forme	-Vue en coupe : bombé, plate, ombiliquée, à centre surélevé -vue par-dessus : ronde.
La surface	Lisse
L'opacité	-Opagues : ne laissent passer la lumière -Translucides : laissent passer la lumière mais on ne voit pas la forme au travers -Transparentes : laissent passer la lumière et voir les formes au travers
consistance	Les colonies grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).
La couleur (pigmentation)	Les colonies habituelles sont crèmes. Une couleur différente due à des pigments.

b. Identification Microscopique

i. Observation à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés.

Technique de la préparation de l'état frais

- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame ;
- Prélever une fraction de colonies sur gélose ;
- Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum ;
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air ;
- Le liquide ne doit pas déborder (si non jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer) ;
- Observer à l'objectif X40 ;
- Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant car les bactéries sont vivantes ;

Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux appelés mouvements browniens, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité.

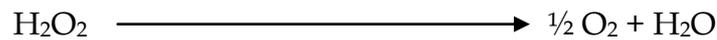
ii. Coloration de Gram

L'examen du frottis coloré au Gram permet d'observer les éventuelles bactéries présentes, les différencier en Gram + et Gram -. La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (DeLarras, 2007) (Annexe B).

c. Identification biochimique

i. Recherche de Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage selon la réaction suivante :



ii. Dégradation du Mannitol (Milieu Mannitol-Mobilité)

Ce milieu permet de rechercher simultanément l'utilisation du Mannitol et la mobilité. Le milieu est ensemencé par piqure centrale, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée chargée de la culture à étudier et incubé à 37°C pendant 24 heures à 48heures. La fermentation du mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.

Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble Du milieu, tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**DELARRAS, 2007**).

iii. Production de l'H₂S

La détermination de la production de H₂S par les isolats est recherchée sur milieu classique Triple Suger Iron. agar (TSI) inoculé avec la souche sélectionnée et incubé à 37°C pendant 24H, la production se traduit par noircissement du milieu (**ARICI et al, 2004**).

iv. Etude de la fermentation du glucose, saccharose et lactose

Le milieu TSI (Triple Suger Iron. agar) permet de mettre en évidence la dégradation du Glucose, lactose, et du saccharose, la production éventuelle du sulfure d'hydrogène (H₂S) et la production de gaz (CO₂). Ce milieu est composé d'un culot et d'une pente, et contient le rouge de méthyle comme un indicateur de pH (**Halassi, 2009**).

v. Galerie API

Galerie API est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comportant 20 tests biochimiques miniaturisés.

- *Principe*

La galerie est commercialisée dans des boîtes stériles, elle comporte 20 micro tubes contenant des substrats sous forme déshydratée, chaque micro tube est partagé en deux parties : le tubule (en bas) et la cupule (en haut).

Les 20 micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

- *Préparation de la galerie*

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir à l'aide d'une pipette graduée stérile (10 ml) d'eau distillée stérile, dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans les boîtes d'incubation.

- *Préparation de l'inoculum*

Suivant les conditions et les précautions de travail indiquées dans la notice d'API20E : 5ml de l'eau physiologique (Na Cl 0,9%) stérile est utilisée, ensuite et à l'aide d'une anse prélever à partir d'une culture jeune (18-24 heures) une seule colonie bien isolée sur un milieu gélosé. Une suspension bactérienne est obtenue après une homogénéisation. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- *Ensemencement de la galerie API 20 E*

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette stérile, puis appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation des bulles d'air ;

- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de paraffine stérile ;
- Pour les caractères encadrés ce qui est le cas des tests : VP et GEL, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension ;
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension ;
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- *Lecture de galerie*

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture. Si les 03 tests ou plus sont positifs, noter sur la fiche les résultats observés puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- **Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncé indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- **Test IND** : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

- *Interprétation*

L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification. Ce logiciel fait la comparaison symptomatique de tous les résultats obtenus pour la souche étudiée avec les informations contenues dans la base des données. Cette dernière est constituée par l'ensemble des taxons, groupes de bactéries que l'API 20 E permet de distinguer les uns des autres et par pourcentage de positivité de chaque test pour chaque taxon.

4.3.2 Antibiogramme des souches isolé

L'antibiogramme se fait par l'utilisation de la méthode par diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques et la mesure des diamètres (la méthode de Kirby Bauer, est recommandée par l'OMS, 2005).

L'antibiogramme ou la détermination de la sensibilité aux agents antibactériens est l'étude de la croissance bactérienne en présence des antibiotiques de différentes familles. Le but essentiel est l'aide à la décision thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne qui orientera ultérieurement l'antibiothérapie probabiliste, et à l'identification bactérienne par la mise en évidence des résistances naturelles.

- *Préparation de l'inoculum*

Prélever une à deux colonies puis transvaser dans un tube contenant 10 ml de l'eau physiologique stérile : émulsionner les colonies sur le bord du tube ensuite agiter.

- *Ensemencement des boites*

- Couler les boites de Pétri par la Gélose Mueller Hinton ;
- Tremper un écouvillon stérile sec dans l'inoculum ;
- Éliminer l'excès d'inoculum (en pressant l'écouvillon et en le faisant rouler contre les parois du tube au-dessus du niveau du liquide) ;
- Ensemencer en stries sur toute la surface de la boite répéter l'opération 2 fois en tournant la boite de 60° à chaque fois Passer enfin l'écouvillon sur le bord de la gélose ;
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- *Application des disques d'antibiotiques*

Appliquer les disques d'antibiotiques sur la gélose Muller-Hinton ensemencé en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérile à la flamme du bec Bunsen. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement, une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres.

- *Incubation*

Incuber les boîtes 18 H à 37° C dans certains cas, la durée d'incubation peut être prolongée à 24 heures.

- *Lecture*

Après l'incubation, mesurer et noter le diamètre de chaque zone d'inhibition en mm. À l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée. Classer la bactérie dans l'une de ces catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante

4.3.3 Méthode de quatre boîtes (NA 2821, 1992)

La vérification de la présence des résidus des antibiotiques dans le foie de poulet de chair par la méthode de référence de la norme algérienne (NA 2821, 1992) qui utilise la technique de quatre boîtes a recommandée l'utilisation des souches des références American type Culture Collection (ATCC).

Tableau 4.2 : Codes des souches bactériennes de références utilisées.

Souche bactérienne	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Micrococcus luteus</i>	9341

a. Caractéristiques des souches bactériennes

- *Préparation de pré-culture*

À partir des tubes inclinés des souches bactériennes, nous avons préparé des cultures jeunes, les bactéries sont inoculées dans le bouillon nutritif et incubé à 37° C pendant 18 à 24h, ensuite, les boîtes de pétri coulées avec Muller-Hinton de sont ensemencées avec l'inoculum des cultures jeunes et incubées à 37° C pendant 18 à 24h.

- *Coloration de gram*

La morphologie, l'arrangement des cellules et le type pariétal des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique « **Annexe B** ».

b. Antibiogramme de confirmation

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques Il ya trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des résultats des tests de sensibilité in vitro : Sensible (S) Résistant (R) et intermédiaire(I) (CASFM, 2016).

Le protocole consisté à :

- Liquéfier le milieu de Muller-Hinton dans le bain marie à 95°C ;
- Coller dans 6 boîtes pétri après un refroidissement à 45°C ;
- Ensemencer séparément par la technique de l'inondation les deux souches bactériennes : *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- Déposer les disques antibiotiques (**Annexe B**) maximum 6 dans chaque boîte ;
- Incuber les boîtes à 30°C pour *Bacillus subtilis* et à 37°C *Micrococcus luteus* pendant 24h.

- **Mode opératoire**

Revivification des souches a partir d'un tube contenant une gélose inclinée de GN nous avons prélevé une colonie de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Nous l'avons ensemencé dans 5ml de cœur-cervelle l'ensemble est incubé pendant 18h à 37°C.

- c. Méthode proprement dite**

La technique des 4 boites : l'objectif cette méthode est de mettre en évidence ; à l'aide des microorganismes sensibles des résidus de substance à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foie. Elle est basée sur l'inhibition de la croissance de bactéries de genre *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*. Elle est réalisée au moyen de boites de pétri contenant une gélose ensemencée avec la souche *Micrococcus luteus* ou la souche *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition dépourvues de colonies bactériennes autour des points de dépôts des échantillons (morceau de foie et papier imbibé du jus de foie) sont révélatrices de la potentielle d'ATB.

- d. Préparation des milieux de culture**

Les pH des milieux de culture « **Annexe A** » préparés, ont été ajusté à trois pH (6 ; 7, 2 et 8), ensuite, ils ont stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 121° C.

- e. Préparation des microorganismes sensibles**

La préparation des suspensions de *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* se fait par ensemencements sur un bouillons cerveau-cœur et incubation à 37°C pendant 24 heures. Des cultures fraîches ont été nécessaires pour chaque analyse.

- f. Traitement des échantillons**

- Retirer les échantillons du congélateur, les déposer sur un plateau en acier inoxydable.

- Découper à l'aide d'un emporte-pièce les carottes cylindriques de viande congelées de 2mm d'épaisseur et de 8mm de diamètre (8 rondelles pour chaque échantillon).

g. Préparation des quatre boîtes

Le protocole expérimental utilisé est le suivant :

- L'ensemencement des boîtes de culture par les souches bactériennes sensibles aux ATB, à savoir : *Bacillus subtilis* à pH 6,0 ; 7,2 ; 8,0 et *Micrococcus luteus* à pH 8,0 ;
- Le dépôt, à la surface du milieu ensemencé, d'une rondelle de chair (foie) congelée suivi d'une incubation à la température optimale de développement du microorganisme.

Les ATB éventuellement présents vont diffuser dans le milieu et inhiber ainsi la croissance de l'organisme test, ce qui entrainera la formation d'une zone d'inhibition autour du disque de foie.

Tableau 4.3 : Les familles d'antibiotiques détecté par chaque type de boîte

Germe	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Micrococcus luteus</i>
	N° de la boîte	01	02	03
Milieu	à pH 6	à pH 7,2	à pH 8	à pH 8
Orientation	Bétalactamines ou tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bétalactamines et macrolides

h. Lecture des résultats

Pour chacune des quatre boîtes, sont considérés comme positifs, les échantillons donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins égale à 2mm. L'essai est recommencé à 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 comme négatif.

Chapitre 5

Résultats

5.1 Examen Macroscopique

Les principaux aspects macroscopiques des souches obtenus sur les différents milieux utilisés ont présenté dans les figures suivantes :



Figure 5.1: Principaux aspects macroscopiques sur gélose nutritif *Figure 5.2 : Principaux aspects macroscopique sur Hektoen*



Figure 5.3 : Principaux aspects macroscopiques sur Chapman *Figure 5.4 : Principaux aspects macroscopiques sur King B*



Figure 5.5 : Principaux aspects macroscopiques sur King A

5.2 Examen Microscopique

L'examen microscopique des suspensions des échantillons analysés a montré la dominance des formes Cocci et bacilles à Gram positive et négative avec différent type de regroupement (**Figure 5.6 et 5.7**).

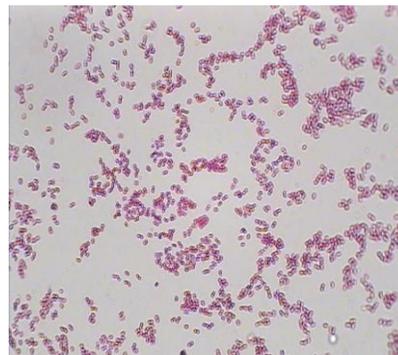


Figure 5.6 : Bactérie isolée à Gram + *Figure 5.7 : bactérie isolée à Gram -*

5.3 Tests d'identification des isolats

Tableau 5.1 : Résultats des tests biochimiques

Isolat	Gram	Catalase	Mobilité	Fermentation de mannitol	TSI			
					H ₂ S	Culot	Ponte	Gaz
S1	-	+	-	+	-	+	+	+
S2	-	+	-	-	-	+	+	+
S3	-	+	+	+	+	+	+	+
S4	-	+	+	-	-	+	-	+
S5	-	+	-	+	-	+	+	+
S6	-	+	-	+	-	+	+	+
S7	-	+	-	-	-	+	+	+
S8	-	+	-	-	+	+	+	+
S9	-	+	+	-	-	+	+	+
S10	-	+	+	-	-	+	+	+
S11	+	+	-	-	-	+	-	+
S12	+	+	-	+	-	+	+	+

5.4 Identification biochimique des différents isolats API20^E

À partir des résultats présentés sur le (tableau 5.1), et à l'aide d'un logiciel d'identification, on a pu identifier nos isolats et les rapprocher aux espèces présentées dans le (tableau 5.2).

Tableau 5.2 : Résultats des tests de l'identification biochimique réalisée par API 20e

<i>Souches d'entérobactéries</i>	<i>Identification</i>
S1	<i>Escherichia coli 1</i>
S2	<i>Pseudomonas horysihabitans</i>
S3	<i>Enterobacter sakazaki</i>
S4	<i>Serratia liquefaciens</i>
S5	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
S6	<i>Serratia liquefaciens</i>
S7	<i>Serratia ordrifera 1</i>
S8	<i>Serratia liquefaciens</i>
S9	<i>Pseudomonas putida</i>
S10	<i>Serratia liquefaciens</i>
S11	<i>Staphylococcus lentus</i>
S12	<i>Staphylococcus lentus</i>

5.5 Antibiogramme de l'identification

Tableau 5.3 : Diamètre critique des antibiotiques utilisés (CASFM, 2012)

Antibiotiques	Diamètres critiques (mm)	
	Sensible	Résistant
Tétracycline	≥ 19	< 17
Pénicilline G	≥ 29	< 18
Amikacine	≥ 17	< 15
Kanamycine	≥ 17	< 15
Amoxicilline	≥23	<16
Gentamycine	≥15	<13
Ciproflaxine	≥25	<22
Streptomycine	≥15	<13
Erythromycine	≥22	<17
Ampicilline	≥21	<16
Tobramycine	≥18	<16
Triméthoprime	≥16	<12
Clindamycin	≥15	<15
Céfazoline	≥18	<12
Colistine	≥15	<15

Tableau 5.4 : Résultats du test de la sensibilité des isolats aux antibiotiques

ATB	Min-Max(en mm)					
	AK	GN	TE	K	P	AX
échantillons	0-24	15-40	0-40	0-29	0-25	0-30

5.6 Méthodes de quatre boîtes

5.6.1 Résultats des tests de confirmation

a. Coloration de Gram

La (Figure 5.8) a montré les formes bacilles avec les extrémités arrondies et une coloration violette, ces bactéries sont disposées en amas et en chaînettes caractérisant les *Bacillus subtilis* a Gram positifs. Dans la même figure et droite (b), les *Micrococcus luteus* ont paru après une coloration de Gram sous forme sphériques (des coques) avec une coloration aussi violette, ces cellules ont associé en 2 ou 4, et en grappes ce qui confirme leur coloration de Gram positif (+) et leurs aspects microscopiques.



(a) *Bacillus subtilis* Gram(+)



(b) *Micrococcus luteus* Gram(+)

Figure 5.8 :Coloration de Gram des souches bactériennes testées

b. Antibiogramme

Les résultats de la sensibilité/résistance des souches bactériennes de références testés vis-à-vis une nombreuse famille d'antibiotiques ont présenté dans la **Figure 5.9** et les diamètres des zones d'inhibitions dans le (**Tableau 5.5**).

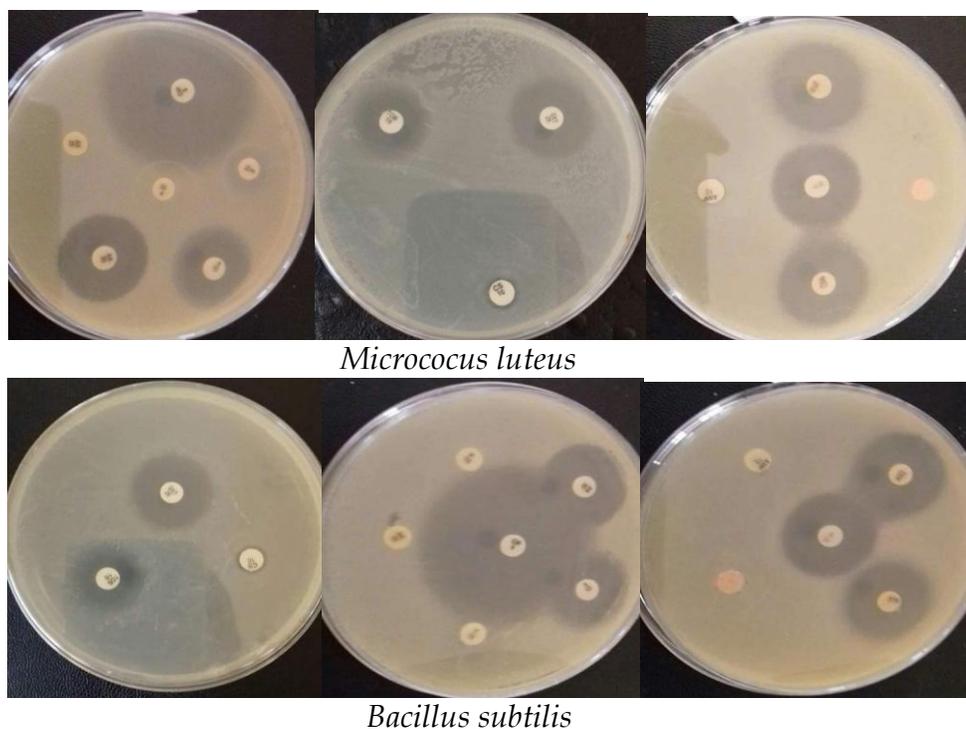


Figure 5.9 : L'antibiogramme des souches bactériennes testées.

La souche *Bacillus subtilis* a présenté une sensibilité marquée aux : Tétracycline (TE30), Amikacine (AK30), Kanamycine (CIP5), Cependant, elles ont résisté aux restes des antibiotiques utilisés notamment la Pénicilline G (P10), l'Erythromycine (E15).

Concernant la *Micrococcus luteus*, et comme le montre le tableau suivant ; cette souche est très sensible aux (CIP5), (AK30), (TE30), (SXT25), (AMP10), (E15), (CL10) et à la (K30), et a résisté à l'effet antibactérien de la (P10), (DA2) et la (TOB10).

Tableau 5.5 : Résultats d'antibiogramme de confirmation

	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Micrococcus luteus</i>	
	Zone d'inhibition (mm)	Présentation	Zone d'inhibition (mm)	Présentation
CIP5	44	S	45	S
CL10	6	R	16	S
AMP10	0	R	0	R
P10	0	R	0	R
TE30	23	S	22	S
DA2	0	R	0	R
AK30	25	S	23	S
K30	24	S	23	S
E15	0	R	0	R
S10	12	R	24	S
TOB10	16	R	7	S
SXT25	21	S	20	S

Tableau 5.6: Zones d'inhibition obtenues pour les échantillons analysés avant cuisson

	Avant cuisson (foie)				Avant cuisson (jus de foie)			
	<i>Bacillus Subtilis</i>			<i>Micrococcus Luteus</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>			<i>Micrococcus Luteus</i>
	pH = 6	pH = 7.2	pH=8	pH=8	pH=6	pH=7.2	pH=8	pH=8
X ± E.S	16,28±1.04	16,14 ±1.01	19.43±1.37	19.50±0.98	19.83±1.66	12.28±0.28	13.28±0.89	17.10±2.48

Moyenne ± ErreurStandard

Tableau 5.7 : Zones d'inhibition obtenues pour les échantillons analysés après cuisson

	Après cuisson (foie)				Après cuisson (jus de foie)			
	<i>Bacillus Subtilis</i>			<i>Micrococcus Luteus</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>			<i>Micrococcus Luteus</i>
	pH = 6	pH = 7.2	pH=8	pH=8	pH=6	pH=7.2	pH=8	pH=8
X ± E.S	18,33±2.02	17,33 ±0.33	21.00±0.55	19.75±1.1	10.25±0.48	*** anom	12.00±1.06	14.17±1.18

Moyenne ± Erreur Standard

Les boîtes à pH 6 de *B.Subtilis* (Boîte N°1), ont révélé des zones d'inhibition de diamètre moyenne ($16,28 \pm 1.04$ mm) témoigne d'une présence des résidus tétracycline et /ou Béta-lactamines ; cette valeur moyenne n'exclut pas ces échantillons de la chaîne alimentaire car elle est inférieure à la norme (20 mm) mais peut être impliqué dans le déclenchement des mécanismes de antibiorésistance chez certaines bactéries normalement sensibles à ces « médicaments ».

Au pH 7.2 de *B.subtilis* (Boîte N° 2), nous avons enregistré un diamètre moyen de ($16,14 \pm 1.01$), d'après cette valeur nos échantillons est exempt des sulfamides.

Contrairement aux pH 6 et 7,2, la croissance de *B.subtilis* à pH 8 (Boîte N° 3) est inhibée autour des disques des foies disposés dans les boîtes (19.43 ± 1.37) l'effet antimicrobien dans ce cas est très marqué. Ainsi ce résultat est considéré comme positive (< 20 mm) est corrélé avec un échantillon contaminé par des aminosides.

La même constatation a été observée dans la boîte N° 4 à pH 8 de *M.Luteus*, des zones d'inhibitions (19.50 ± 0.98) Autour des disques des foies. Cette dernière est utilisée dans la recherche des résidus des antibiotiques pour révéler la présence des macrolides et /ou Béta-lactamines. Pour les résidus de ces derniers les échantillons positifs pourraient donc être déclarés non consommables et potentiellement dangereux pour la santé humaine.

Chapitre 6

Discussion

Les antibiotiques occupent une place de choix dans l'élevage avicole, L'utilisation des antibiotiques tant en médecine humaine que vétérinaire s'est accompagnée de l'apparition de résistances dont le corolaire est la diminution de l'efficacité de ces molécules et l'incapacité de guérir certaines maladies bactériennes. Ce phénomène est devenu d'autant plus inquiétant que l'offre en nouveaux antibiotique s'est tarie en l'absence de découverte de principes actifs intéressants pour la médecine.

C'est pour cette raison nous avons entamé cette étude, dont la coloration de gram des différents milieux a montré que les bactéries isolées sont des grams positifs et négatifs.

L'aspect macroscopique et microscopique de ces bactéries et d'après les résultats des tests d'identification biochimiques obtenus nous permis de présumer que ces microorganismes font partie de trois grandes familles : *les entérobactéries, des pseudomonas et staphylocoques.*

Dans les denrées alimentaires d'origine animale, *les entérobactéries* sont d'origine intestinale ou environnementale, leur présence en grands nombres dans des produits traités thermiquement et dans les produits prêts à être consommés peut avoir une signification en termes de santé publique (**Ray, 2001**). Cependant, les *Pseudomonas* sont ubiquistes et peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses. Peu virulentes, plusieurs souches sont des pathogènes opportunistes pour l'homme et des agents d'altération des viandes, poissons et produits laitiers. Les espèces les plus fréquemment rencontrées chez l'homme sont *Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, P. putida et P. stutzeri* (**Euzéby, 2007**). Les *Pseudomonas* sont les principales bactéries psychrotrophes retrouvées dans les viandes, le lait et, dans

une moindre mesure *Pseudomonas* est principalement utilisé comme indicateur d'altération des viandes fraîches et du lait (**Labadie et al, 1996**).

Dans autre sens, le genre *Staphylococci* est un parasite saprophyte de l'homme et de l'animal. Cette bactérie peut être disséminée facilement dans l'environnement et peut ainsi contaminer les aliments (**Le Loir, 2003**), toutefois certains d'entre eux doivent faire l'objet d'une grande attention, ce sont le lait cru ou fermenté, les œufs et les ovoproduits, la viande de boucherie en l'état ou hachée, les abats et les volailles.

L'antibiogramme est devenu un outil indispensable dans le choix judicieux de l'antibiotique. Il existe une résistance naturelle et une résistance acquise aux antibiotiques. (**Daniel & Hans, 2003**). Les trois catégories cliniques qui ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro sont : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

Dans notre enquête nous avons trouvé un envahissement de foie par des *Entérobacter sakazaki*, *E.Coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia ordrifera*. Ces dernières sont normalement marquées par une sensibilité naturelle aux amoxicillines selon **Roughyatou, (2013)**. Ceci pourrait être expliqué par l'acquisition de ces bactéries d'une résistance qualifié « acquise » vis-à-vis de ces ATB. Ce mécanisme de la résistance acquise au β -lactamines pouvait être due à une inactivation enzymatique par β -lactamases, une imperméabilité grâce à la disparition de pourine qui provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines β -lactamines comme cela a été mise en évidence chez certain entérobactéries (**Nicaïdo, 2000**), ou une modification de cible par la perte d'affinité des PLP (Protéine liant pénicillines) pour les β -lactamines par mutation, et par conséquent une acquisition d'un gène ou fragments génétique codant pour les PLP d'affinité diminuée ou hyperproduction de PLP normal. Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez les entérobactéries (**Bonnet, 2006**).

La sensibilité de tous les souches isolées aux aminosides est marquée sauf pour : *E.coli*, *enterobacter sakazaki*, *Serratia liquefaciens*, *Raoultella ornithinolytica* qu'ont montré une

résistance anormale (acquise). Alors que, ces bactéries sont naturellement sensibles aux aminosides (**Roughyatou, 2013**). Mais d'après nos résultats, cette insensibilité aux ces antibiotiques pourraient être expliqué par l'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de résistance le plus souvent observé. Il permet d'expliquer la résistance de plus de 95 % des souches d'entérobactéries résistantes aux aminosides. Le déterminisme génétique est souvent plasmidique (**Perichon et al., 2007**). Il existe trois classes d'enzymes différentes classées en fonction du radical qu'elles ajoutent à la molécule d'aminoside : les N-acétyltransférases(AAC) qui neutralisent les fonctions – N112, les O-nucléotidyltransférases (ANT), et les O phosphotransférases (APH) qui neutralisent les fonctions –OH (**Doublet, 2004**)

Nous avons appliqué la méthode microbiologique « dite : méthode des quatre Boites» qui est la méthode officielle appliquée dans nos laboratoires de contrôle de qualité des aliments (**NA2821, 1992**), pour rechercher des résidus d'antibiotiques sur 7 échantillons de foies poulet de chair.

La contamination des denrées alimentaire d'origine animale a été rapportée par de nombreux auteurs. En effet en Algérie de nombreuses études ont rapporté la présence de résidus, dans la région de Tizi Ouzou selon **Hakem et al, (2013)** les analyses des échantillons ont dévoilé la présence de 124 échantillons positifs sur 145 prélevés, soit un pourcentage de 86,2 %. Dans la même région, **Ramdane(2015)** signale un taux de 60 % d'échantillons positifs. Ces évidences nous permis de comparer avec nos résultats dont 7 échantillons de foie analysés 5 sont positives.

Une étude réalisée en Suisse (**SISQA, 2003**) portant sur un effectif total de 55 échantillons de viande de volaille provenant de différentes régions du monde : Chine (19), Brésil (6), Hongrie (8), l'Europe de l'Ouest (12), Europe de l'Est (4) Thaïlande (3) et le Chili (2) a révélé que 20 échantillons sont positifs à la présence de résidus d'antibiotiques soit un taux de 36 %.

Cette présence pourrait s'expliquer par l'utilisation abusive des antimicrobiens probablement liés à un traitement des animaux suivi d'un délai d'attente insuffisant (**Corpet et Brugere, 1995**). L'hypothèse de l'ajout des antibiotiques comme additif

alimentaire (facteur de croissance) de façon officieuse reste fortement suspectée malgré l'interdiction de cette pratique.

La consommation de certains produits alimentaires y compris les viandes ne sera pas possible qu'après une cuisson adéquate, c'est pour cette raison que nous avons testé nos échantillons avant et après une cuisson à 80°C pendant 45min. des différences ont été enregistrées les mêmes échantillons analysés avant et après cuisson, nous expliquons la présence des zones d'inhibition après cuisson parfois très élevées que seules non cuites par l'effet de la haute température sur la molécule des antibiotiques révélés par cette expérimentation d'une part, et sur la stabilité de la structure cellulaire de la matrice musculaire d'autre part.

Car selon les travaux de (**boucher et al. , 2009**) presque similaire à notre étude, qui a observé des résultats différents entre les mêmes échantillons analysés en utilisant des jus de viande extraite à l'effet de la température ambiante et après passage au bain marie, ces dernières ont marqué par la présence des résidus, tandis que les premiers ont montré des résultats négatifs.

La sensibilité des antibiotiques aux hautes températures est variée d'un sujet à un autre, selon les travaux de (**Ibrahim&Moats, 1994 ; Moats, 1999**) les méthodes de cuisson ordinaires ne sont pas capables de dégrader complètement les résidus des antibiotiques. Alors que, **Kuhne et al. (2001)** ont trouvé que l'effet d'un antibiotique peut s'accroître après un traitement thermique, et c'est dû à l'apparition des produits de dégradation qui sont plus toxiques que la molécule mère.

Conclusion Générale et Perspectives

La production de volaille se développe de plus en plus en Algérie et tend à se moderniser. Cependant, cette viande de volaille destinée à la consommation locale n'a pas bien bénéficié de contrôle comme pour les autres produits alimentaires. En effet, l'utilisation massive des antibiotiques et les sélections consécutives des souches résistantes peuvent faire craindre le pire. La principale voie de transmission de microorganismes résistants de l'animal à l'homme se fait via la chaîne alimentaire. Ainsi, la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques, d'importance stratégique en médecine humaine et vétérinaire, constitue une charge importante pour la santé publique et animale.

C'est pour cette raison, la présente étude a réalisé sur des échantillons de foie de poulet de chair, l'identification des isolats nous ont permis de constater que les entérobactéries de genres *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella* et *Enterobacter* ont présenté. Les tests d'antibiogramme ont révélé une résistance marquée des Entérobactéries aux antibiotiques tels que : Amoxicillines, Kanamycine, Amikacine et de même une sensibilité aux Gentamicine.

À l'issue de la méthode de quatre boîtes, les principales familles des antibiotiques présent sont les : B-lactamines, les macrolides et les aminosides. Cette coexistence des entérobactéries et des résidus d'antibiotiques nous permis de corrélér l'antibio-résistance de ces bactéries à la présence des résidus des antibiotiques.

De ce faite, les conséquences de l'utilisation des antibiotiques en production animale en absence du respect des normes et des délais d'attentes peuvent être préjudiciables pour la santé du consommateur par le développement de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

De plus, l'estimation de la contamination des produits alimentaires par les résidus des antibiotiques est faite dans la plupart du temps sur la viande crue, alors que,

cette dernière ne pourra être consommée qu'après une cuisson adéquate. Donc il est impérieux dévaluer la présence ou l'absence de ces substances toxiques sur des aliments prêts à consommer. En effet, les modes des préparations culinaires des produits alimentaires peuvent être changés l'équation. La cuisson domestique induit une désintégration de la structure myofibrillaires causée par l'effet de la chaleur ce qui traduit par la libération de résidus emprisonnés dans le contenu intracellulaire au milieu extérieur et augmente leurs concentrations dans le jus.

En Algérie l'application de la réglementation est absente en matière de contrôle quasi-inexistant des éleveurs et des vendeurs ce qui rend la situation très délicate. D'où la nécessité de prendre des mesures et d'agir rapidement pour améliorer la situation et protéger les consommateurs, ainsi Aux éleveurs pour l'abandon des mauvaises pratiques, la santé animale devant incomber uniquement aux professionnels (vétérinaire et auxiliaires bien formés)

Références bibliographiques

A

- Aarestup, F.M., Agerso, Y., Smidt,P.G, Madsen, M. et Jensen, L.B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *E. faecalis* and *E. faecium* from humans in the community, broilers and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37: 127-137
- AFSSA, 2000. Risques de contamination bactérienne, Rapport du groupe de travail «Alimentation animale et sécurité sanitaire des aliments». Direction De L'évaluation Des Risques Nutritionnels Et Sanitaires P : 136. 139.
- AFSSA. (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Rapport du groupe de travail "Antibiorésistance". [En ligne]. Maisons-Alfort : AFSSA, 214 pages. Disponible sur : <http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-ABR.pdf>
- AGENCE FRANCAISE DE SECURITE ALIMENTAIRE, 2000. Rapport «Alimentation et sécurité sanitaire des aliments ». -177p

B

- Bonnet R, 2006. β -lactamines et entéobactéries. Chapitre 15. Livre antibiogramme. Paris. ESKA : 2ème édition. P 143.
- Boucher O, Muckle G, Bastien CH. 2009. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: a neuropsychologic analysis. *Environ Health Perspect* 117:7-16.
- Brouillet P(2002). Résidus de médicaments dans le lait et tests de détection *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 2002, 15, p171

-Butaye, P., L.A. Devriese and F. Haesebrouck (2003). "Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effect of less well know antibiotics on gram-positive bacteria." *Clin Microbiol Rev* 16(2): 175-188.

C

-Casewell, M., C. Friis, E. Maco, P. McMullin and I. Phillips (2003). "The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health." *J Antimicrob Chemother* 52(2): 159-161.

-CASFM. (2012). Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie, recommandations 2012

-Chadwick, P.R., N. Woodford, E.B. Kaczmaraski, S. Gray, R.A. Barrell and B.A. Oppenheim (1996). "Glycopeptide-resistant enterocci isolated from uncooked meat." *J Antimicrob Chemother* 38(5): 908-909.

-Châtaigner. B et Stevens. A(2003) - Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar (Institut Pasteur de Dakar), page 3-15, 51. http://www.redev.info/Doc/Polagri/III-Pol-Agri-securite-alimentaire/III-3-Dev-local/Enquete_residus_AB_Senegal.pdf
(Consulter le 20-11-2016)

-Châtaigner. B et Stevens. A. (2005). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar (Institut Pasreur de Dakar), page 3-7, 51

-Chatellet. M-C (2007) - Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, page 9-90.Thèse de docteur vétérinaire, École nationale vétérinaire d'ALFORT.

-Collier,C.T.,M.R. Smiricky-Tjardes, D.M. Albin, J.E. Wubbem, V.M. Gabert, B. Deplancke, D.B. Anderson and H.R. Gaskins (2003)."Molecular

Références bibliographiques

ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. "J Anim Sci 81 (12): 3035-3045.

-Corpet D.E. et Burgere H.B. (1996) - Résidus des antibiotiques dans les aliments d'origine animale : conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effets chez l'homme. *Rev. Méd. Vét.*, (146) :72-82.

-Corpet D.E., Brugere H.B(1996). Résidus des antibiotiques dans les aliments d'origine animale :consequences microbiologiques, evaluation de dose sans effet chez l'homme. *Rev. Méd. Vét.*, **146**, 72-82.

-Corpet. D-E (1999) Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques, page 99-103. *Revue Méd. Vét .*, 2000, 151, 99-104.

D

-D'COSTA VM., KING CE., KALAN L., MORAR M., SUNG WWL., SCHWARZ C., et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**, 457-461.

-Danhaive. P (1986) - Détection d'antibiotiques de type B-lactames dans les viandes par la méthode Penzym®, page61-63.*Annales de médecine vétérinaire (périodique mensuel)*, ISSN0003- 4118,1986 - T.130 - N°1 (JANVIER).

-Daniel Genné, Hans H. Siegrist, 2003, De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique, *Med suisse* No 20, p : 464

-Davies. J(1994). "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes." *Science* 264(5157): 375-382.

-De hoffmann E, Stroobant V (2005) - Cours spectrométrie de masse 2005, page4-33.Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio Organique UMR 7512(Dir : Alain Van Dorsselaer) CNRS -Université Louis

Références bibliographiques

PasteurStrasbourg.http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/3eme-annee/gap/MmeSanglier05-10-05/Intro_SS.pdf.(Consulterle 20-04-2017).

-Devie . P, Divol . A, Gilbert . G, Laurent . S, Le Goaziou . A, Olivon . M, Petit. J (2006). Les antibiotiques dans l'alimentation animale, page 1-30.

-Doublet B. (2004). Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicol floR chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Université de tours, France.

E

-Eloit. M (2004) - Plan de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les viandes d'animaux de boucherie, de volailles, de gibiers ,de lapins et de poissons d'élevage, page 2. <IMG/pdf/dgaln20068240z-3.pdf> (Consulter le 20-04-2017).

-EUZÉBY J.P. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [en ligne] (juin 2007)
Adresse URL : [http:// www.bacterio.cict.fr/bacdico/](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/), consulté le 15/08/2007

-Everett, S.L., R.P. Lowalski, D. Landsittel, R. Day and Y.J. Gordon(1995). “ An in vitro comparison of the susceptibilities of bacterial isolates from patients with conjunctivitis and blepharitis to newer and established topical antibiotics.” *Cornea* 14(4): 382-387.

F

-FERRON A. (1994). Chapitre 76: La résistance des bactéries aux antibiotiques, In *Bactériologie Médicale*. 15th ed., Ed. C. et R., Paris, 12 pages.

-Fontaine. M, (1992). *Vade-Mecum du vétérinaire*. 15ème édition. Volume 1, ENV Lyon, pp 256-275.

-Frayse. J. L et Darré. A (1990) Produire des viandes sur quelles bases économiques et biochimiques, volume 1, page 5-49, 264-269.

G

-**Gaudin. V, Fabre. J-M, Rault. A (2006)** – Validation AFNOR des méthodes alternatives d’analyse –Application à la détection des résidus d’antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires, page5-9.Rapport d’étude préliminaire pour la validation AFNOR du Premi Test®.http://www.afnor-validation.org/rapports_synthese/DSM/Synt%20DSM%2028-1%2006-06.pdf(Consulterle 26-01-2017).

-**GUERIN-FAUBLEE V., (2010)**. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. *in: Journées Nationales GTV, Lille*, p. 93–101.

-**Guillemot. D (2006)** - Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, page10-214. (AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).http://www.cndwebzine.hcp.ma/cnd_si/MG/pdf/35821/35822pdf.(Consulterle20-01-2017)

H

-**Hakem (ex Akam) A., Titouche Y., Houali K., Yabrir B., Malki O., Chenouf N., Yahiaoui S., LABIAD M., GHENIM H., KECHIH-BOUNAR S., CHIRILA F., LAPUSAN A. and FIT N.I. 2013** - Screening of Antibiotics Residues in Poultry Meat by Microbiological Methods. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 70(1): 77-82.

-**Helmut, R. and E. Bulling (1985)**. “Criteria and methods for the microbiological evaluation of growth promoters in animal feeds. “Berlin: Bundesungeheitsamt.

I

-**Ibrahim A, Moats WA. (1994).** Effect of cooking procedures on oxytetracycline residues in lab muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2563-2563.

J

-**JOUY E. ; MEUNIER D. ; MARTEL J.L.; KOBISCH M.; COUDERT M. ; SANDERS P., 2002.** Méthodologie du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les principales bactéries pathogènes des animaux de rente (RESAPATH). *Bull. Acad. Vét. De France*, 155, (3/4) : 277-282

-**Julie. B. (2014).** Utilisation raisonnées des antibiotiques en élevage porcin, démarche d'accompagnement dans sept élevages, science vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, 2014, p11

K

-**KEREN I., SHAH D., SPOERING A., et al., (2004)** Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **24**, 8172-8180

-**Klare, I., H. Heier, H. Claus, R. Reissbrodt and W. Witte (1995b).** "vanA-mediated highlevel glycopeptides resistance in enterococcus faecium from animal husbandry". *FEM Microbiol Lett* 125(2-3): 165-171.

-**Klotins . K (2006)** Utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance: controverse et solutions.

-**Kuhne T., Imbach P., Bolton-Maggs P., Berchtold W., Blanchette V., Buchanan G. (2001)** Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet* 358: 2122-2125.

L

-**LABADIE J.C., DOUSSET X., HEBRAUD M.** Les *Pseudomonas* et autres bactéries Gram - d'altération. In : Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (Eds.),

Références bibliographiques

Microbiologie alimentaire. Tome 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Technique et Documentation: Paris, 1996, 209-220.

-**Larbier et Leclercq, (1992)**. Nutrition et alimentation des volailles. Edition INRA-paris (france)

-**Le Loir, 2003** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research 2(1):63-76

-**Lullmann H, Mohr K, Ziegler A. 2001**. Atlas de poche de pharmacologie. 2^{ème} édition française, Médecine-Sciences Flammarion paris, France, pp 264-327

M

-**Maghuin-Rogister. G, Janosi. A, Helbo. V, Van Peteghem. C, Sanders.E, Van Eeckhout. N, Cornelis. M, Jouret. M (2001)** - Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires 27 -59.RapportFinalSSTC1998 2001.

-**Moats, W. A. (1999)**. The Effect of processing on veterinary residues in foods. In: Impact of processing on Food Safety, pp. 233-241. Springer, US.

N

-**Nicaido H, 2000**. "Crossing the envelope : how cephaslosporin sreach their targets. " Clin Microbial Infect; 22-26

-**Norme algérienne, NA (2821). (1992)**, Viande fraîche - Recherch des résidus de substances antimicrobiennes. Premier édition : 1992 édition et diffusion 5.

P

-**Perichon, B., Courvalin, P. & Galimand, M. (2007)**. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic

fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2464-2469.

-**Philips, I. (2007)**. "Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health." *Int J Antimicrob Agents* 30(2): 101-107.

-**Puyt. J-D, Guérin -Faublée. V (2006)** - Médicament anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie. Edition 2006, page 1-27.

R

-**Ramdane M.S. (2015)** - Etude qualitative et quantitative des résidus d'antibiotiques dans la viande de volaille et les oeufs dans la région de la Mitidja. Utilisation des probiotiques comme alternative. Thèse de doctorat Es Sciences spécialité sciences biologiques .Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 89 p.

-**RAY B.** Indicators of bacterial pathogens. In : Ray B. (Ed.), *Fundamental food microbiology*. CRC Press : Boca Raton, 2001, 409-417.

-**Roughyatou Ka, 2013**, Lecture interprétative de l'antibiogramme des entérobactéries

S

-**Samanidou, V.F. and E.N. Evaggelopou (2008)**. "Chromatographic analysis of banned antibacterial growth promoters in animal feed." *J Sep Sci* 31 (11): 2091-2112.

-**Sanders P. (2005)**. L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. *Bull. Acad. vét. Fr.*, **158** (2), 137-142.

-**Schouten, M.A. and A. Voss (1997)**. "VRE and meat." *Lancet* 349: 1258.

-**Scippo. M-L (2008)** - Technologie, sécurité et qualité des aliments introduction à la qualité et la sécurité des aliments : aspects chimiques.

Références bibliographiques

Contrôle des résidus et des médicaments vétérinaires, page 2-36. Université de Liège, faculté de médecine vétérinaire.
<http://www.adaoa.ulg.ac.be/> (Consulter le 19-01-2017).

-**SISQA, 2003**- Salon international de la qualité alimentaire "alimentation et santé". Décembre 2003, organisé par le conseil régional Midi-Pyrénées. (cf. mps n 1441). "1er Carrefour des technologies de la sécurité et de la traçabilité des aliments". (www.sisqa.org)

-**STOLTZ R. (2008)** Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale Thèse de doctorat, Université Claude-Bernard ,Lyon)

-**STOLTZ R. (2008)** Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale Thèse de doctorat, Université Claude-Bernard ,Lyon)

T

-**TANCREDE C., 1983'**. Antibiothérapie en médecine vétérinaire et risques pour la santé humaine. Rec. Med. Vét, 159 (6) : 591-594

W

-**Werner, G., I. Klare, H. Heier, K.H. Hinz, G. Bohme, M. Wendt and W. Witte(2000)**. "Quinupristin/dalfopristin-resistant enterococci of the satA (vatD) and atG (vatE) genotypes from different ecological origins in Germany." Microb Drug Resist 6(1):37-47.

-**Witte, W., I. Klare and G. Werner (1999)**. "Selective pressure by antibiotics as feed additives. " Infection 27(Suppl 2): S35-38.

www.belspo.be/belspo/home/publ/pub_ostc/NP2/Rnp035s_fr.pdf.(Consulter le 15-02-2017).

Annexe A

Gélose TSI (Triple Sugar Iron)

Peptone de viande.....	15g
Protéose peptone.....	5g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Glucose.....	1g
Saccharose.....	10g
Lactose.....	10g
Citrate de fer ammoniacal.....	0,3g
Chlorure de sodium.....	5g
Sodium thiosulfate.....	0,3g
Rouge de phénol.....	0,05g
Agar	18g
Eau distillée.....	1000 mL
pH.....	7,2

Gélose nutritive

Peptone	10 g
Extrait de levure.....	5 g
Na Cl.....	5 g
Agar	15-20 g
Eau.....	1000 mL
pH.....	7,2

Bouillon nutritif

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
Na Cl.....	5 g
Eau distillée	1000 mL
PH.....	7,2

Les annexes

Annexe A

Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	2 g
Amidon.....	15 g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Agar.....	17 g
Eau distillée.....	1000 mL
pH.....	7,3

Bouillon coeur-cerveau (BHIB), Institut Pasteur d'Alger, Algérie)

Infusion de cervelle de veau.....	200 g
Infusion de coeur de boeuf.....	50 g
Peptone de gélatine.....	10 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Phosphate disodique.....	2,5 g
Glucose.....	2 g
pH.....	7,4

Gélose Chapman (Institut Pasteur d'Alger, Algérie)

Extrait de viande.....	1 g
Chlorure de sodium.....	75 g
Peptone.....	10 g
Gélose.....	15 g
Mannitol.....	10 g
Rouge de phénol.....	0.025 g
pH.....	7.4

Annexe A

king A (41.4/990ml+10ml glycerol)

Gelatine peptone (pancreatic).....	20g
magnesium chloride.....	1.4g
potassium sulfate.....	10g
Agar.....	10g
PH.....	7.2

King B (33g/990+10ml glycerol)

Mixed peptone.....	20g
Dipotassuim hydrogen phosphate	1.5g
Magnessuim sulfate.....	1.5g
Agar.....	10g
PH.....	7.2

Annexe A

➤ La composition des milieux de culture a différent PH :

Antibiotic assay medium No.8

- ❖ Peptic digest of animal tissue.....6.00 g/1
- ❖ Yeast extract.....3.00 g/1
- ❖ Beefextract.....1.50 g/1
- ❖ Agar.....15.00 g/1
- ❖ pH.....5.9(+0.2)

Antibiotic assay No.9

- ❖ Casein enzymic hydrolysate.....17.00 g/1
- ❖ Peptic digest soyabean meal.....3.00 g/1
- ❖ Dextrose.....2.50 g/1
- ❖ Sodium chloride.....5.00 g/1
- ❖ Dipotassuim phosphate.....2.50 g/1
- ❖ Agar.....20.00 g/1
- ❖ pH.....7.2 (+0.2)

Antibiotic assay No.11

- ❖ Peptic digest of animal tissue.....6.00 g/1
- ❖ Casein enzymic hydrolysate.....4.00 g/1
- ❖ Yeast extract3.00 g/1
- ❖ Beef extract1.50 g/1
- ❖ Dextrose1.00 g/1
- ❖ Agar15.00 g/1
- ❖ pH.....8.3 (+0.2)

Les annexes

Annexe B

- Tableau représente les 10 types des disques des antibiotiques qu'on a les utilisées.

Les Antibiotiques	symboles
Ampicilline	AMP10
Pénicilline	P10
Tétracycline	TE30
Amikacine	AK30
Kanamycine	K30
Erythromycine	E15
Streptomycine	S10
Trimethprime	SXT25
Tobramycine	TOB10
Amoxicilline	AX
Gentamycine	GN

Annexe B

Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 15 à 30 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau distillée. À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 10 à 30 secondes à la *fushine* (ou *safranine*) pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage à l'eau distillée, on sèche le frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen et on l'examine à l'objectif (X 100) à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007).