

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE -ALGER
المدرسة الوطنية للبيطرة – الجزائر

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister

Option

Hygiène et sécurité alimentaire

Thème

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RESIDUS D'ANTIMICROBIENS DANS LE MUSCLE DE POULET DE CHAIR

Présenté par :

Melle Chabha Ben Mohand

Soutenu le 13 Décembre 2007

Jury

Melle M. Ben Mahdi :	Maître de Conférence	Présidente
Mr A. Benouaddah :	Maître de Conférence	Promoteur
Mr B. Bendeddouche :	Maître de Conférence	Examineur
Mr M-T. Hamdi :	Chargé de Cours	Examineur
Mme S. Temim- kessaci :	Maître de Conférence	Examinatrice

Année universitaire : 2007/2008

Remerciements

Je dédie ce mémoire à mes chers parents adorés et à tout les membres de ma famille qui mon soutenu par leurs appuis durant mon travail.

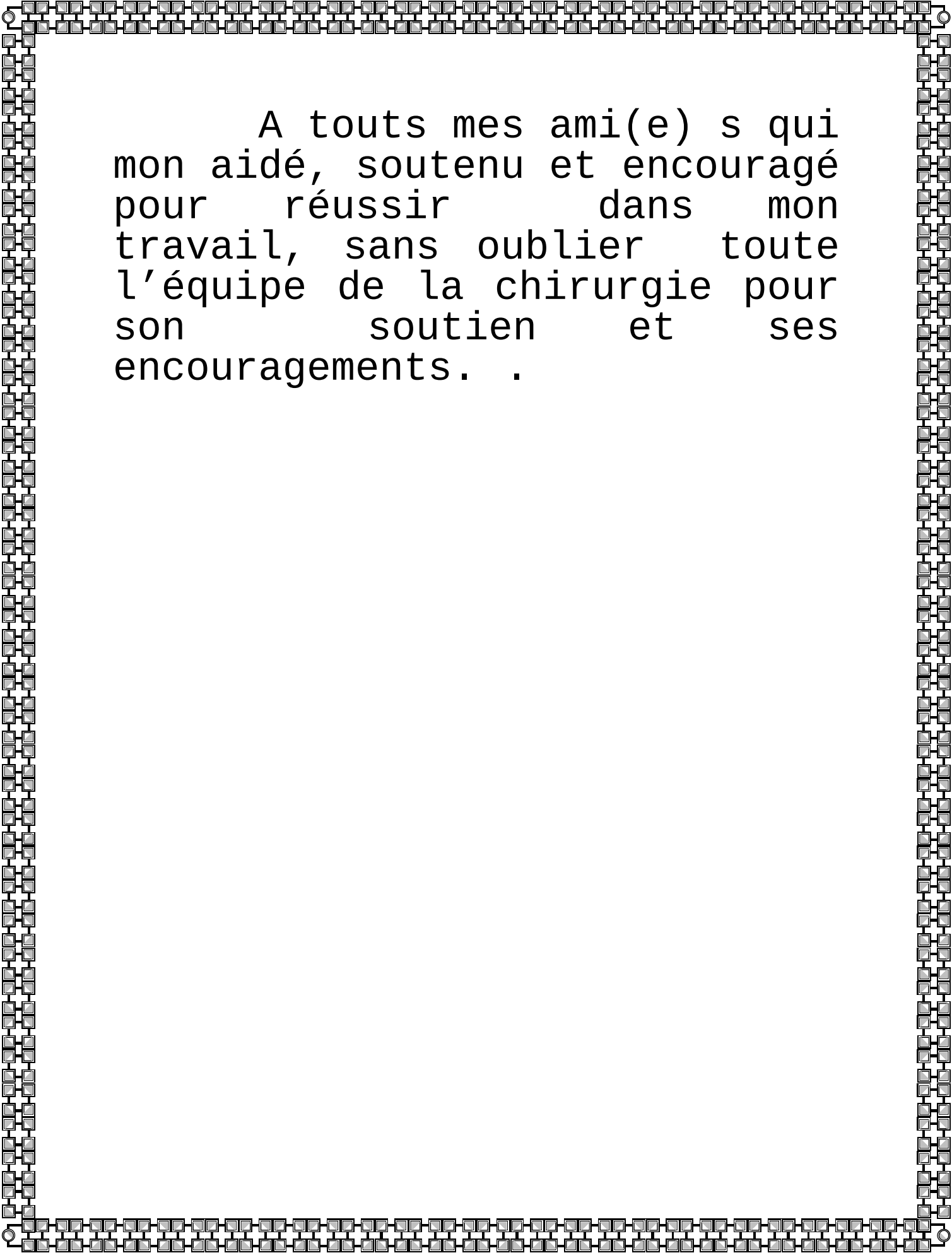
Je remercie Mr Ghozlane le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire, ainsi que tout le corps Enseignants qui m'ont donné la chance de réaliser ce mémoire.

Je tiens à remercier Mr Djbairia, le responsable du laboratoire Central de l'Intendance Militaire sis à El Harrach, ainsi que l'ensemble de l'effectif du laboratoire de microbiologie alimentaire et de toxicologie qui m'ont assistés et aider pour accomplir la partie expérimentale.

Touts mes respects et reconnaissance au promoteur Mr A. Benouaddah pour sa patience et ces conseils et la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces années.

Je remercie chaleureusement Melle M. Benmahdi. d'avoir accepté être la présidente de jury avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs Ben Deddouche.B et Hamdi.M.S et Mme Témmim.S qui ont accepté de juger ce mémoire avec beaucoup d'attention et qui ont accepté d'en être les examinateurs.



A tous mes ami(e) s qui
mon aidé, soutenu et encouragé
pour réussir dans mon
travail, sans oublier toute
l'équipe de la chirurgie pour
son soutien et ses
encouragements. .

RESUME

Notre travail porte sur l'étude des résidus d'antibiotiques dans le poulet de chair, produit qui connaît une large consommation vu sa disponibilité et son prix raisonnable pour toutes les catégories sociales.

Notre recherche est menée sur le muscle du bréchet d'une trentaine d'échantillon dans le but de détecter les résidus appartenant à deux groupes de produits utilisés en thérapeutique vétérinaire:

- les antibiotiques
- les sulfamides

Pour cet effet, nous avons appliqué deux méthodes :

- Méthode microbiologique: Elle permet la mise en évidence des antibiotiques (pénicillines, macrolides, aminosides) et des sulfamides à l'aide de micro-organismes sensibles (dans notre étude : *Bacillus subtilis*, *micrococcus luteus*), mais sans déterminer leur identité. Deux familles d'antibiotiques sont détectés avec cette technique : bêta lactame (pénicilline G) et macrolides (érythromycine) sur deux échantillons des trente analysés.
- Chromatographie liquide haute performance (HPLC): C'est une méthode plus sensible, permet l'identification et la quantification des résidus d'antibiotiques, et la confirmation des résultats obtenus avec la méthode microbiologique.

Après une permise une mise au point d'un protocole d'analyse avec HPLC, la totalité des échantillons étudiés été positifs à la pénicilline G avec des concentrations supérieures à 50µg/kg de muscle, limite maximale de résidus de cet antibiotique tolérée et fixée par le Règlement CEE n° 2377/90 du conseil du 04 mars 1999 (Maghuin et al. ,2001).

Cependant, l'érythromycine a été recherchée sur un seul échantillon pour des raisons de contraintes techniques et dans le but de confirmer le résultat de la méthode microbiologique et sa concentration été dans les normes.

Mots clés: Viande de volaille, résidus, antibiotiques, détection

Abstract

Our work concerns the study of the antibiotic residues in the product, table fowl which knows a raised request considering its availability and its reasonable price for all the social categories.

Our search for antibiotic residues in the muscle is undertaken on a sample of a private breeding located in the area of Bouira. To identify the antibiotic residues, we practised the microbiological method frequently used in the laboratories, but to quantify them, we developed a new method: liquid chromatography high pressure. These two processes highlighted the residues of two families of antibiotics: Penicillin G, and erythromycin. The first allowed to identify residues penicillin G in two samples, whereas the second identified and quantified in the totality of the analyzed samples. In those, the revealed concentrations largely exceed the maximum limit of residues authorized. This second method with also made it possible to quantify the concentration of the erythromycin in the positive sample analyzed with the microbiological method.

Sommaire

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviation

Introduction

Partie Bibliographie

Chapitre I : Production avicole dans le monde et rappels sur l'élevage du poulet de chair

Partie I : Production avicole.....	1
1. Production avicole dans le monde	1
2. Production avicole en Algérie	2
Partie II : Rappels sur l'élevage de poulet de chair	4
1. Normes techniques.....	4
1.1 . Alimentation	4
1.2 . Traitements sanitaires	5
2. Réglementation	6
2.1 . Réglementation Européenne	6
2.2 . Réglementation Algérienne	9

Chapitre II : Les substances antimicrobiennes

1. Définition des antimicrobiens	11
2. Nature des substances antimicrobiennes	11
2.1 . Antibiotiques	11
2.1.1. Définition des antibiotiques	11
2.1.2. Classification des antibiotiques.....	11
2.1.3. Usage des antimicrobiens en élevage avicole	13
2.1.3.1. Usage thérapeutique	13
2.1.3.2. Usage zootechnique	13

2.1.4. Principaux antibiotiques utilisés dans les élevages avicoles	14
a. Les Beta-Lactamines	14
b. Les Aminosides ou Aminoglycosides	14
c. Les Macrolides	14
d. Les Tétracyclines	15
2.1.5. Mode d'action des antibiotiques	15
a. Action sur la paroi.....	16
b. Action sur la membrane des cellules	16
c. Action sur l'ADN	16
d. Action sur les protéines	16
2.1.6. Pharmacocinétique des antibiotiques	17
a. Absorption	17
b. Diffusion tissulaire	17
c. Biotransformation	18
d. Elimination	18
2.1.7. Evaluation de l'activité des antibiotiques	20
a. Antibiogramme	20
b. Concentration minimale d'inhibition CMI	21
c. Concentration minimale bactéricide CMB	21
2.1.8. Association des antibiotiques	21
2.2 . Les Sulfamides	22
2.2.1. Définition des sulfamides	22
2.2.2. Mode d'action et métabolisme des sulfamides	22
3. Risques présentés par l'usage des antimicrobiens	23
3.1 . Présence des résidus	23
3.1.1. Définition de résidus	23
3.1.2. Causes de la présence des résidus dans la viande	24
3.1.3. Préoccupations.....	24
3.2 . L'acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries.....	25
3.2.1. Résistance naturelle.....	25
3.2.2. Résistance acquise.....	25

3.3 . Modalités de résistance des bactéries	25
3.3.1. Mécanismes biochimiques de résistance	26
a. Le brouillage.....	26
b. Le camouflage.....	26
c. Le blindage	26
d. L'esquive	26
3.3.2. Mécanismes génétiques de résistance	27
a. Transduction	28
b. Transformation	28
c. Conjugaison	28

Chapitre III: Méthodes de dépistage des résidus

1. Méthode microbiologique	29
1.1 . Diffusion sur gélose	29
1.2 . Technique en milieu liquide	30
2. Méthode immunologique	30
2.1 . Radio Immuno Assay (Tests RIA)	30
2.2 . Radio Récepteur Assay (RRA)	30
2.3 . Test ELISA	30
2.4 . Le test Penzym	31
2.5 . Test β -STAR	32
3. Méthode physico-chimique.....	32
3.1 . Chromatographie en phase liquide à haute pression	32

Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériels	33
1. Matériels de la méthode microbiologique	33
1.1 . Matériels biologiques	33
1.1.1. Viande blanche	33
1.1.1.1. Origine des échantillons	33
1.1.1.2. Prélèvement des échantillons	34
1.1.2. Micro-organismes utilisés	34
1.2 . Produits chimiques et réactifs	35
1.2.1. Milieux de culture	35
1.2.2. Réactifs	35
1.2.3. Antibiotiques	35
1.3 . Appareillages	35
2. Matériels de la méthode chromatographique	36
2.1 . Appareillages	36
2.2 . Réactifs	36

Chapitre II : Méthodes

1. Méthode microbiologique	37
1.1 . But	37
1.2 . Principe	37
1.3 . Application	37
1.3.1. Remise en activité des micro-organismes test.	37
1.3.2. Préparation de l'inoculum	38
1.3.2.1. Dilutions des solutions mères	38
1.3.2.2. Ensemencement des dilutions sur gélose Triptocaseine soja	39
1.3.2.3. Dénombrement	39
1.3.3. Recherche de résidus d'antibiotiques dans le muscle	40
1.3.3.1. Préparation des géloses	40
1.3.3.2. Préparation des solutions d'antibiotiques témoins	40
1.3.3.2.1. Préparation de la solution Triméthoprime	40
1.3.3.2.2. Préparation de la solution Dihydrostreptomycine	40

1.3.3.3. Préparation des boîtes de Pétri	41
1.3.3.4. Traitement des échantillons	42
2. Méthode chromatographique	43
2.1 . Préparation des solutions	43
2.1.1. Préparation des solutions pour traiter les échantillons	43
2.1.2. Préparation des solutions étalons d'antibiotiques	44
2.1.2.1. Préparation de la solution mère de Pénicilline G 100µg/ml	44
2.1.2.2. Préparation de la solution mère d'érythromycine 100g/ml.....	44
2.2 . Préparation des échantillons	45
2.2.1. Extraction	45
2.2.2. Déprotéinisation	45
2.2.3. Purification	45
2.3 . Injection de l'éluât dans HPLC	46
2.4 . Quantification des concentrations de résidus	47
2.4.1. Quantification de pénicilline G présente dans les échantillons	47
2.4.2. Quantification d'érythromycine présente dans les échantillons	48

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie I : Résultats.....	49
1. Résultats de la méthode microbiologique	49
2. Résultats de la méthode chromatographique	52
2.1 . Résultat de la pénicilline G	52
2.1.1. Résultat de la pénicilline G étalon 20µg/ml	52
2.1.2. Résultat des échantillons	52
2.2 . Résultat d'érythromycine étalon 20µg/ml	54

Partie II : Discussion

Conclusion

Perspectives

Bibliographie

Annexe

Liste des tableaux

Tableau I: Les principaux pays producteurs de poulet de chair-----	1
Tableau II: Structure de la production avicole en Algérie (OFAL, 2000) -----	2
Tableau III: Evaluation de la disponibilité de la viande blanche en Algérie-----	3
Tableau IV: L'aliment destiné au poulet de chair durant les différentes phases d'âge-----	4
Tableau V: les traitements médicaux effectuées aux poulets de chair-----	6
Tableau VI: Textes officiels et interdictions concernant plusieurs additifs en alimentation animale. -	8
Tableau VII: Les antibiotiques homologués en Algérie comme facteur de croissance-----	9
Tableau VIII: Les antibiotiques homologués en Algérie à usage thérapeutique-----	10
Tableau IX: les principales classes d'antibiotiques spectre et mode d'action-----	12
Tableau X: Paramètres pharmacocinétiques de quelques antibiotiques-----	19
Tableau XI: Familles d'antibiotiques tests en fonction des souches et du pH du milieu-----	34
Tableau XII: Les diamètres d'inhibition des antibiotiques témoins-----	49
Tableau XIII: Nombre d'échantillons positifs aux antibiotiques tests-----	50
Tableau XIV: Diamètre des zones annulaires des échantillons positifs-----	51
Tableau XV: Résultats de la méthode microbiologique-----	51
Tableau XVI: Concentrations des échantillons en pénicilline G trouvées par HPLC-----	53

Liste des figures

Figure 1: Mode d'action des différentes familles d'antibiotiques -----	15
Figure 2: Les zones translucides d'un antibiogramme -----	20
Figure 3: La lecture d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé ---	20
Figure 4: Mode d'action des sulfamides -----	23
Figure 5: Modalité de résistance chez la bactérie-----	27
Figure 6: Réseau de transfert de résistance à l'homme-----	28
Figure 7: Principe du Radio Immuno Assay et du Radio Récepteur Assay -----	31
Figure 8: Principe Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) -----	31
Figure 9: Principe du B-STAR 100 -----	32
Figure 10: Les étapes de l'activation des souches-----	38
Figure 11: Les dilutions de la solution mère de BS pour la recherche de l'inoculum-----	39
Figure 12: Disposition des échantillons sur la boîte de Pétri -----	42
Figure 13: Résultats de la méthode microbiologique-----	50
Figure 14: Pic de la pénicilline G étalon 20µg/ml-----	52
Figure 15: Histogramme des concentrations des échantillons en pénicilline G -----	54
Figure 16: Pic de l'érythromycine étalon 20µg/ml-----	54
Figure 17: Pics de l'érythromycine et de la pénicilline G à 20µg/ml-----	55
Figure 18: Les pics de l'échantillon numéro 15-----	56

La liste des abréviations

ACIA :	Agence canadienne d'inspection des aliments
AFNOR :	Association française de normalisation
Afssa :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
BHT :	Buthyl Hydroxy Toluène
CAC :	Comité du Codex Alimentarius
CBIPT :	Centre Belge D'information Pharmacothérapeutique
CCLIN:	Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
HPLC :	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Pression
CIV :	Centre d'Information des Viandes
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CNC :	Chambre Nationale de Commerce
CNRC:	Centre Nationale des Registres de Commerce
D.M.V :	Direction des Médicaments Vétérinaires
DSV :	Direction des Services Vétérinaires
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FMPMC:	Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie
ITAVI :	Institut Technique Avicole
J.O :	Journal Officiel
LMR :	Limite Maximale de Résidus
MADR:	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
OFAL :	Observatoire de La Filière Avicole
OFIVAL:	Office International des Viandes et de l'Aviculture
ONAB :	Office Nationale des Aliments de Bétail
RIA:	Radio Immuno Assay
RRA :	Radio Récepteur Assay
SIMV :	Syndicat National des Médicaments Vétérinaires et réactifs
U.E :	Union Européenne
UCL :	Université Catholique De Louvain

Introduction :

Avec les grands investissements consentis par les secteurs privés et publics, Portées par l'engouement du consommateur algérien pour les produits d'origine avicole, la production avicole en Algérie connaît un développement considérable.

Cependant, l'intensification du développement de la filière avicole n'évolue pas sans problèmes, ce qui risque de porter atteintes à la rentabilité et à la qualité des produits.

Afin de remédier à ces contraintes, la médication et la prophylaxies sont recommander pour d'amortir les pertes économiques. L'antibiothérapie arrive en première position.

Les antibiotiques sont utilisés en élevage dans un but thérapeutique, mais également incorporés à faible dose à l'alimentation, dans un but strictement zootechnique en vue d'améliorer les performances animales. Cette utilisation en tant que promoteur de croissance date des années 50, (Vanbelle, 2001). Cependant, depuis 1970, leur utilisation à cet effet, a été revue à la baisse suite aux dangers des résidus d'antimicrobiens présents dans les denrées alimentaires d'origine animale et suite à l'apparition de bactéries résistantes qui menacent l'homme

De ce fait, les mesures prises au niveau international vont dans le sens de la restriction, voire de l'interdiction totale de l'usage des promoteurs de croissance antibiotiques, comme c'est le cas en Suède depuis 1986 et au Danemark depuis 2000 (Gourmelen *et al.*, 2002). Cependant, depuis janvier 2006, l'interdiction totale de leur l'utilisation est effective (Dardenne *et al.* , 2005).

En vertu de ce règlement, seuls les additifs qui auront les limites maximales de résidus (LMR) fixées et qui auront fait l'objet d'une procédure d'autorisation, pourront être mis sur le marché (Gourmelen *et al.*, 2001).

Depuis quelques années, l'inocuité et la qualité des aliments d'origine animale constituent un sujet de préoccupation par le consommateur algérien, surtout après la vaste médiatisation du problème de la vache folle, et plus récemment de la grippe aviaire. Un risque plus inquiétant et plus courant menace le consommateur, mais peu ou pas connu par la société algérienne par manque d'information et de sensibilisation: la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes.

Même si les risques chimiques sont moins importants dans leurs conséquences immédiates, en comparaison de celles de certains risques microbiologiques, les résidus et les contaminants dans les denrées carnées doivent être rigoureusement contrôlés.

En Algérie, la recherche des résidus d'antibiotiques dans les viandes de poulet de chair a déjà été réalisée. Ces études réalisées avec des méthodes qualitatives, ont décelé des résidus sur les échantillons analysés sans toutefois quantifier leurs concentrations pour les comparer à leur limite maximale de résidus autorisée.

Notre travail a porté sur la recherche et la quantification des résidus d'antimicrobiens dans la viande de volaille type poulet de chair.

L'analyse a été réalisée sur trente (30) échantillons provenant d'un élevage privé de la wilaya de Bouira.

Notre étude a été réalisée avec deux méthodes :

- Microbiologique, par diffusion sur gélose.
- Chromatographie liquide par haute pression.

Le but de notre travail est la mise au point d'une méthode d'analyse pour quantifier les résidus d'antibiotiques en vue de juger de l'état de salubrité des produits avicoles commercialisés sur le marché, ainsi de contribuer à faire une évaluation du nombre et du type d'antibiotiques utilisés en élevage avicole.

Chapitre I : La production avicole dans le monde et rappels sur l'élevage du poulet de chair :

Partie 1 : La production avicole :

1. La production avicole dans le monde :

Après une année 2004 atypique marquée par l'extension de la grippe aviaire H5N1 en Asie du Sud-Est, la production mondiale de viande de volaille a augmenté en 2005. En effet, même si l'épizootie est loin d'être éradiquée et qu'elle s'est même étendue à la Russie et à l'Europe, la production est repartie à la hausse en Chine et en Thaïlande qui a converti une partie de son offre en produits cuits. La production a été également en forte croissance chez les deux plus gros fournisseurs mondiaux, le Brésil et les Etats-Unis, qui ont su répondre à une importante demande internationale. Ces deux pays couvrent désormais près des trois quarts ($\frac{3}{4}$) des exportations mondiales (Tableau I) (Office de l'élevage, 2006).

Tableau I: Les principaux pays producteurs de poulet de chair

Les nations	2001	2002	2003	2004	2005*	%05*/04
Etats unis	16998	17496	17686	18192	18752	+3.1
chine	12866	13523	13687	13220	13420	+1.5
UE**	9377	9366	9015	10969	11013	+0.4
Pays accédant à l'UE	1635	1765	1853	-	-	-
Moyen-Orient⁽¹⁾	4426	4432	4613	4776	4633	-3.0
Brésil	6919	7690	7910	8880	9703	+9.3
Europe de l'est⁽²⁾	390	414	410	467	461	-1.3
Japon	1184	1221	1240	1242	1123	-9.6
Russie	820	950	1035	1186	1280	+7.9
Thaïlande	1366	1445	1451	950	1000	+5.3
Total pays sélectionnés	58 865	61376	62068	63162	64728	+2.5
Total monde	71951	74612	76294	78559	80366	+2.3

Source: OFIVAL d'après GIRA, FAO, Commission européenne

* Estimations

** UE à 15 de 2000 à 2003, UE à 25 après 2003 à 2005

(1) Afrique du Nord incluse

(2) Roumanie, Bulgarie, Croatie, Bosnie, République Fédérale de Yougoslavie

Déjà altérée par la crise du Syndrome Respiratoire Aigue (SRAS) en 2003, la consommation du poulet de chair a stagné en Asie du Sud-Est, puis s'est encore détériorée en 2004 et 2005 suite à l'épidémie de grippe aviaire H5N1 qui a causé la mort de dizaines de personnes (environ 70 décès déclarés fin 2005) après leur contamination par des animaux infectés. Par contre elle a progressé dans plusieurs grands pays, y compris aux Etats-Unis, où elle est de loin la plus élevée au monde lorsqu'elle est ramenée par habitant (Office de l'élevage, 2006).

2. La production avicole en Algérie :

En Algérie, le secteur avicole a connu un lancement énorme résultant des politiques mises en œuvre par l'Etat au début des années quatre vingt, dans la perspective d'assurer l'autosuffisance alimentaire. Cette filière a subi des transformations importantes consécutives aux réformes économiques et au processus de libéralisation enclenchés depuis les années 90. La production avicole en Algérie est le fait d'éleveurs privés et d'entreprises publiques économiques. Toutefois, la production de ces dernières reste insignifiante par rapport à celle des exploitations privées qui représente 92 % de la production nationale en viandes blanches (Tableau II) (OFAL, 2000).

Tableau II: Structure de la production avicole en Algérie (OFAL, 2000)

Produits	Exploitations Etatiques		Exploitations Privées		Total	
	Production	%	Production	%	Production	%
Viandes blanches (Tonne)	12916	7.6	156266	92.4	169182	100

Mais, depuis des années, aucune évolution significative n'est apparue dans la structure des élevages privés et plusieurs anomalies sont à signaler telles:

- le sous investissement chronique en matière d'infrastructures et d'équipement.
- le non renouvellement des investissements réalisés.
- la simplification des itinéraires techniques. Exemple, la taille moyenne des ateliers d'élevage n'est que de 3000 à 5000 sujets de poulets de chair.
- La pratique saisonnière de l'élevage avicole, dictée par des considérations technologiques et commerciales (OFAL, 2000).

Trois postes grèvent les dépenses d'élevage avicole en Algérie; à savoir : l'aliment, le matériel biologique et les produits vétérinaires.

D'autre part, les conditions d'élevage étant inadéquates (ventilation statique, sous équipement chronique des ateliers, faible isolation des bâtiments, maîtrise insuffisante des conditions d'ambiance), conduisent à une faiblesse relative des performances zootechniques, ce qui entraîne l'allongement du cycle d'élevage, avec un gaspillage important et des taux de mortalité élevés (OFAL, 2000).

La disponibilité du poulet de chair et son prix raisonnable sont les facteurs qui ont toujours incité le citoyen algérien à s'orienter vers la consommation de cette viande, qui a connu une demande élevée au cours de ces dernières années, malgré les crises qui ont touché la filière (Tableau III).

Tableau III: Evaluation de la disponibilité de la viande blanche en Algérie

Années	1989	1996	1997	1998	1999	2000
Viandes blanches Kg/habitant/an	11.5	55.3	78.1	55.2	63.3	55.3

Source : OFAL, ESCAVI, 1999

Partie 2 : Rappels sur l'élevage de poulet de chair :

La filière avicole a connu un grand progrès, essentiellement du aux coûts réduits des financements et à la facilité de manipulation de l'élevage pendant une courte période de vie (Beaumont. C, 2004).

1. Les normes techniques :

Deux semaines avant la réception des poussins, l'accoureur prévoit le nettoyage du local et sa désinfection deux (02) fois, à huit (08) jours d'intervalle. Il doit commander l'aliment, installer la litière souple et épaisse (10cm), allumer la source de chaleur 24 heures avant l'arrivée des poussins et disposer les abreuvoirs autour de l'éleveuse (Ressources Animales, 2007).

1.1. L'alimentation :

L'organisme animal subit continuellement une perte d'énergie compensée par un apport alimentaire équilibré. Ce dernier est composé de substances variées et d'une quantité suffisante de matière protéique avec addition d'acides aminés (tryptophane, lysine, absentes dans le maïs), difficiles à trouver dans les matières premières disponibles (ITAVI, 2001) (Tableau IV).

Tableau IV: L'aliment destiné au poulet de chair durant les différentes phases d'âge

Période	Démarrage	Croissance	Finition
	1 ^{er} jour - 10 ^{ème} jour	11 ^{ème} jour - 42 ^{ème} jour	43 ^{ème} jour - 50 ^{ème} jour
Composition	Mais, tourteaux de soja, issus de meunerie, calcaire phosphate, sel, acides aminés, oligoéléments, poly vitamines.	Mais, tourteaux de soja, issus de meunerie, calcaire phosphate, sel, acides aminés, oligoéléments, poly vitamines.	Mais, tourteaux de soja, issus de meunerie, calcaire phosphate, sel, acides aminés, oligoéléments, poly vitamines.
	-Antioxydant : BHT et vitamines A,D ₃ ,E -Anticoccidien : sendramycine (aviax) -Antibiotiques : (facteur de croissance) bacitracine de zinc	-Antioxydant : BHT et vitamines A,D ₃ ,E -Anticoccidien : sendramycine (aviax) - Antibiotiques : (facteur de croissance) virginiamycine	-Antioxydant : BHT et vitamines A,D ₃ ,E -Anticoccidien : salinomycine (coxistac)

Source ONAB, 2003

* BHT : Buthylhydroxytoluène

1.2. Les traitements sanitaires :

La mise en place d'un plan de prophylaxie est obligatoire et doit comprendre deux catégories d'actions.

- Une prophylaxie hygiénique ou sanitaire qui impose le respect des normes d'hygiène quotidienne et des vides sanitaires entre les bandes.
- Une prophylaxie médicale qui fait appel à la prévention par la vaccination individuelle ou collective, ou par ajouts d'additifs chimiques dans l'alimentation.

Les principales pathologies rencontrées chez le poulet de chair sont :

- maladies virales : Gumboro, Newcastle, Bronchite infectieuse
- maladies infectieuses : Clostridie, Salmonelles
- autres : les carences.

Ci-dessous la synthèse des traitements préconisés en Algérie par les vétérinaires (Tableau V).

Tableau V: les traitements médicaux effectuées aux poulets de chair

SEMAINES	MEDICATIONS
1ère semaine	Anti-stress + Antibiotiques (Néo-terramycine poudre) Vitamines AD ₃ E ; Vaccins : H120 (New Castel, Bronchite infectieuse)
2è semaine	Vitamines AD ₃ E + J ₇ Vaccin Gumboro
3è semaine	J ₁₉ Rappel vaccin New Castel, + Vitamines E J ₂₀ Anticoccidien (vetacox, perusil) J ₂₁ Rappel vaccin Gumboro
4è semaine	Vitamines B+ vitamines multi- oligoélément
5è semaine	J ₃₅ Rappel Gumboro + Vitamines B+ vitamines Multi- oligoélément Anti-stress
6è semaine	Vitamines B+ vitamines multi- oligoélément

2. La réglementation :

2.1. La réglementation Européenne :

Dans les années 40-50, l'industrie agro-alimentaire s'est mise à utiliser régulièrement des antibiotiques dans l'alimentation animale comme facteur de croissance pour accroître sa productivité. En élevage de rente l'usage des antibiotiques était autorisé sous deux types de statuts.

- en tant qu'additif dans un aliment supplémenté pour un effet facteur de croissance, ou en vue d'une prophylaxie anti-coccidienne chez certains groupes d'animaux (catégorie coccidiostatiques).
- en tant que médicaments vétérinaire dans un aliment, pour un traitement préventif ou curatif.
-

Dans certains pays, notamment aux Etats-Unis, le terme additif antibiotique vise toutes les utilisations, que ce soit à titre curatif, préventif, ou en tant que facteur de croissance (Devie et al; 2006).

Susceptibles d'entraîner des phénomènes de résistance chez l'homme, et des problèmes en terme toxicologique ou allergique, la Commission Européenne a décidé d'interdire les antibiotiques comme facteur de croissance (Tableau VI) pour le 1^{er} janvier 2006, ainsi la mise en oeuvre d'un plan de surveillance pour certaines substances et leurs résidus chez les animaux vivants et dans leurs produits.

D'autre part, le règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil fixe une procédure communautaire pour déterminer les limites maximales de résidus (LMR) dans les denrées alimentaires d'origine animale (Maghuin et *al.* ; 2001) afin d'assurer l'innocuité des antibiotiques pour le consommateur et l'animal.

Il existe quatre possibilités de classement de LMR (FNOSAD, 2004).

- Les substances ayant une LMR fixée définitivement
- Les substances non soumises à une LMR, réputées non ou peu toxiques.
- LMR fixées provisoirement (les substances présentent des lacunes ne permettant pas de fixer des LMR définitives et le fabricant dispose d'un délai (inférieur à 5 ans) pour combler ces lacunes.

Tableau VI: Textes officiels et interdictions concernant plusieurs catégories d'additifs en alimentation animale.

Texte officiel	Additif	Catégorie	Décision
Dir. 97/6 de la Commission du 30 janvier 1997	Avoparcine	Antibiotiques	Suspension depuis le 1 ^{er} avril 1997
Dir. 97/72 de la Commission du 15 décembre 1997	Ardacin	Antibiotiques	Suspension de l'autorisation provisoire depuis le 1 ^{er} avril 1998
Règlement (CE) 2821/98 du Conseil du 17 décembre 1998	Phosphate de tylosine Bacitracine zinc Virginiamycine Spiramycine	Antibiotiques	Suspension au 1 ^{er} juillet 1999
Règlement (CE) 2788/98 du Conseil du 22 décembre 1998	Olaquinox Carbadox	Facteurs de croissance	Interdiction au 1 ^{er} septembre 1999
Règlement (CE) 45/1999 de la Commission du 11 janvier 1999	Dinitolmide (DOT) Ipronidazole Arprinocide	Coccidiostatiques	Interdiction au 1 ^{er} octobre 1999
Règlement du Parlement Européen et du Conseil	Salomycine sodium Monensine sodium Flavophospholipol Avilamycine	Antibiotiques	Interdiction au 1 ^{er} janvier 2006

Source : (Devie et al ; 2006)

2.2. La réglementation Algérienne :

La demande en produits vétérinaires n'a pas cessé de croître depuis 1997 en relation avec l'essor notable de la production et la surmédicalisation des élevages avicoles en Algérie.

Légalement, seuls les vétérinaires et les techniciens vétérinaires sont autorisés à délivrer les médicaments. Cependant, il semble qu'en Algérie l'accès aux médicaments vétérinaires est facile et leurs disponibilités dans les marchés noirs, seraient à l'origine de leurs usages anarchiques et de l'automédication.

La liste des antimicrobiens autorisée en Algérie en tant que facteurs de croissance (Tableau VII) a toujours été limitée par rapport à la liste des antimicrobiens utilisés en thérapeutique (Tableau VIII)

Tableau VII: Les antibiotiques homologués en Algérie comme facteur de croissance

Groupe chimique	Molécule	Utilité
Polyéthers ionophores	Salinomycine, monensin de sodium Narasine, semduramycine	Coccidiostatique
Orthosomycines	Avilamycine	Additif
Glycophospholipides	Flavophospholipol	Additif

Source : (MADR 2003)

Tableau VIII: Les antibiotiques homologués en Algérie à usage thérapeutique

Famille	Molécule
Pénicilline	Amoxycilline, Ampicilline
Macrolides	Erythromycine, Spiramycine, Josamycine, Tilimicosine, Tylosine
Sulfamides et Diaminopyrimidines	Sulfadimérasine, Sulfadiméthoxine, Sulfaguanidine, Sulfaméthazine Sulfadiazine, Sulfaquinoxaline ,Sulfamethoxypyridazine,Sulfadimine, Triméthoprine
Tétracyclines	Tétracyclines, Chlortétracyclines Doxycycline, Oxytétracycline
Péptides	Colistine
Quinolones	Acide Oxolinique, Enrofloxacin, Fluméquine
Aminoside	Néomycine, Gentamycine

Source : (MADR, DSV, 2003)

Chapitre II : Les substances antimicrobiennes :

1. La définition des antimicrobiens :

On appelle « médicaments vétérinaires antimicrobiens », des substances naturelles semi synthétiques ou synthétiques qui affichent une activité antimicrobienne en tuant ou en inhibant la prolifération des microorganismes (Comité du codex alimentarius, 2005).

2. La nature des substances antimicrobiennes :

Il existe plusieurs types d'agents antimicrobiens à usages et actions variés. Parmi ces substances

2.1. Les antibiotiques :

2.1.1. La définition des antibiotiques :

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer les bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries ou d'origine synthétique ou demi synthétique (Bryskier, 1999).

2.1.2. La classification des antibiotiques :

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques et plusieurs types de classification sont possibles (chimique, mode d'action, spectre). Ces familles se distinguent par les propriétés physico-chimiques communes des molécules qu'elles contiennent. Chaque molécule dispose d'un mode d'action et d'un spectre propre à elle. (Tableau IX)

Tableau IX: les principales classes d'antibiotiques spectre et mode d'action

Famille	Mode d'action	Principaux groupes ou antibiotiques	Spectre
Acide fusidique	Inhibition de la synthèse des protéines	Acide fusidique	Étroit
Aminosides	Inhibition de la synthèse des protéines	Apramycine, Streptomycine Tobramicine, Gentamicine	Large
Bêta-lactamines	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Groupe de pénicilline G, (oxacilline), Céphalosporines de 1 ^{re} génération	Étroit
		Aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline Céphalosporines : 2 ^e , 3 ^e et 4 ^e génération	Large
Glycopeptides	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Teicoplanine, Vancomycine	Étroit
Macrolides	Inhibition de la synthèse des protéines	Érythromycine, Azithromycine,	Étroit
Nitrofuranes	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Furaltadone, Furazolidone	Large
Phénicolés	Inhibition de la synthèse des protéines	Chloramphénicol	Large
Polypeptides	Action sur la membrane externe des Gram-	Polymyxine B, Colistine, Bacitracine	Étroit
Quinolones et fluoroquinolones	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Acide calidixique, Acide oxolinique, Acide piromidique	Étroit
		Ciprofloxacine, Ofloxacine,	Large
Sulfamides	Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique	Sulfadiazine, Sulfadoxine, Sulfaméthoxydiazine Sulfaméthoxazole	Large
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse des protéines	Chlortétracycline, Doxycycline, Minocycline	Large
Fifamycines	Blocage de la synthèse des ARN messagers	Rifamycine SV, Rifaximine	Étroit
		Ripampicine	Large

Source : <http://www.bacterio.cict.fr/bactico/atbg/tablun.html>

2.1.3. L'usage des antimicrobiens en élevage avicole :

Les antimicrobiens sont très utilisés dans les différents types d'élevage. Sans eux, l'élevage industriel serait impossible et subirait d'énormes pertes.

Les objectifs recherchés dans l'usage des antimicrobiens sont de deux sortes:

- thérapeutiques
- zootechniques.

2.1.3.1. L'usage thérapeutique :

Les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique visant à l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou à la prévention d'une infection possible, lors d'un transport, d'une vaccination ou d'un stress (but prophylactique) (Chaslus-Dancla, 2001).

2.1.3.2. L'usage zootechnique :

Dans les années quarante et cinquante, l'industrie agro-alimentaire, s'est mise à utiliser régulièrement des antibiotiques dans l'alimentation animale comme facteur de croissance pour accroître sa productivité. Leur incorporation dans l'alimentation des animaux, permet une homogénéité des bandes avec un faible écart de poids entre les sujets et la production d'une même quantité de viande, en une période plus courte (Pederson et Edqvist, 2000).

L'effet de ce facteur de croissance implique la flore digestive. A très faible dose, les antibiotiques inhibent les bactéries de la flore intestinal qui catabolisent l'urée et les acides aminés. Ils augmentent ainsi la disponibilité des nutriments et l'énergie pour l'animal et réduisent la production d'ammoniaque, entraînant une diminution du taux de renouvellement de l'épithélium intestinal et épargnant de ce fait les nutriments (Corpet, 2000).

2.1.3.3. Les principaux antibiotiques utilisés dans les élevages avicoles :

L'usage des antibiotiques varie selon les pathologies rencontrées en cours d'élevage. Les plus utilisés sont :

a. Les beta-Lactaminees :

Les Beta-Lactamines représentent la première famille antibiotique administrée chez le poulet de chair. Ce sont des antibiotiques à spectre large et à action bactéricide. Ils sont fréquemment utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires ou comme additifs alimentaires (Biologie et recherche, 2005).

b. Les aminosides ou Aminoglycosides :

Les aminosides ont un spectre d'action étroit : ils inhibent la synthèse des protéines des staphylocoques et des bacilles Gram négatifs. Ils sont parfois utilisés en association avec la pénicilline. Ces antibiotiques, en particulier la néomycine, sont généralement plus toxiques que les autres. Leur usage prolongé peut entraîner des effets secondaires tels : des atteintes du vestibule de l'oreille et/ou des atteintes rénales (Biologie et recherche, 2005).

c. Les macrolides :

Les macrolides sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre étroit, fréquemment utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires ou comme additifs alimentaires et promoteurs de croissance. Ils possèdent une excellente pénétration tissulaire et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Du fait de leur paroi, les entérobactéries sont naturellement résistantes aux macrolides (Biologie et recherche, 2005).

d. Les tétracyclines :

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques, avec un très large spectre d'activité. Elles pénètrent bien dans les cellules.

On distingue deux types de cyclines :

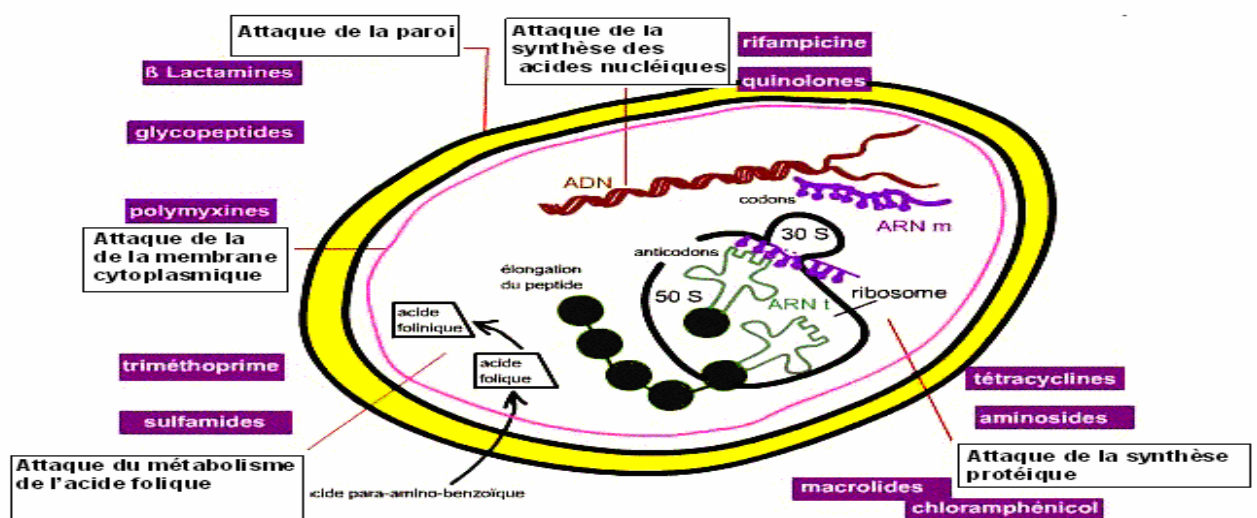
- les cyclines naturelles : chlortétracycline (Auréomycine®), Tétracycline.
- les cyclines semi synthétiques: Oxytétracycline actives sur souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles, elles ont une meilleure absorption digestive et une durée d'action plus longue (Bryskier, 1999).

2.1.3.4. Les modes d'action des antibiotiques :

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, ce qui implique le respect dans la prescription des données pharmacologiques de l'antibiotique, telles que la posologie, la voie d'introduction, la diffusion tissulaire et le métabolisme de la molécule.

Le mécanisme d'action des antibiotiques n'est pas toujours parfaitement élucidé, mais on distingue quatre grands modes d'action (Biologie et recherche; 2005) (Figure 1).

- action sur la paroi bactérienne ;
- action sur la membrane des cellules ;
- action sur l'ADN ;
- action sur le ribosome bactérien ou synthèse protéique.



Source : www-sante.ujf-grenoble.fr

Figure 1: Mode d'action des différentes familles d'antibiotiques

a. L'action sur la paroi :

Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi en inhibant la synthèse du peptidoglycane. La cellule s'allonge sans former de cloison, et explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Ces antibiotiques ne sont actifs que sur les bactéries en croissance (Euzeby, 2005). Ex : polypeptide (bacitracine), bêta lactamine (pénicilline, céphalosporine).

b. L'action sur la membrane des cellules :

Ils agissent sur les lipides membranaires et désorganisent la bicouche (phospholipidique), ce qui détruit l'intégrité membranaire. Ces molécules sont efficaces sur les germes en croissance et au repos. Ex : polypeptide (polymyxine, colistine) (Euzeby, 2005).

c. L'action sur l'ADN :

Les antibiotiques entravent la production de nouveaux chromosomes, certains bloquent les voies métaboliques en amont de la synthèse des acides nucléiques alors que d'autres agissent sur les enzymes qui en sont responsables.

Ces opérations vont entraîner :

- une inhibition de la RNA-polymérase : la rifampicine, fixe la sous unité bêta de la RNA-polymérase bactérienne, bloquant ainsi la transcription de l'ADN bactérien. Son action est bactéricide.
- une inhibition de l'ADNgyrase empêchant ainsi la réplication de l'ADN: ce mode d'action est caractéristique des quinolones.
- action sur la topologie de l'ADN
- inhibition de la réplication de l'ADN par blocage de l'activité de l'ADN polymérase. Ex : mixomycine .

d. l'action sur les protéines :

Les protéines sont nécessaires à la production de nouvelles bactéries. Certains antibiotiques nuisent à la capacité des bactéries à produire des protéines servant à la fabrication d'éléments importants pour la cellule (Euzeby, 2005).

Parmi ces antibiotiques:

- **Les aminoglycosides (la streptomycine)** : se fixe sur la petite sous unité des ribosomes, empêchant la traduction de l'ARN messager et conduisant à des erreurs de lecture donc de traduction.
- **Les phénicols (chloramphénicol)** : bloque la formation de la liaison peptidique. Il reconnaît le segment de la grosse sous unité du ribosome bactérien mais pas celui des ribosomes eucaryotes.
- **Les cyclines (tétracycline)** : en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome, elle bloque l'élongation de la chaîne polypeptidique.
- **Les macrolides (érythromycine)** : agit sur la partie 50S du ribosome et bloque l'élongation de la chaîne polypeptidique.

2.1.3.5. La pharmacocinétique des antibiotiques :

a. L'absorption :

C'est le processus conduisant au passage de l'antibiotique du site d'introduction dans l'organisme, à la circulation générale après avoir traversé une membrane biologique. L'administration par voie intraveineuse conduit à une absorption totale de l'antibiotique. Certaines classes d'antibiotiques ont une bonne absorption digestive (macrolides, tétracyclines, sulfamides) ; pour d'autres classes, l'absorption est nulle (aminosides, polypeptides) et la voie injectable est nécessaire pour obtenir un effet systémique (FMPMC, 2006).

b. La diffusion tissulaire :

L'antibiotique parvient au site de l'infection, suite à un ensemble de processus de répartition qui sont:

- une différence d'affinité entre protéines plasmatiques et protéines tissulaires : plus la fixation aux protéines plasmatiques est importante et forte, moins l'antibiotique peut diffuser dans les tissus car seule la forme libre est diffusable.
- liposolubilité : plus elle est importante plus le passage trans-membranaire est possible.
- irrigation des organes : plus l'organe est vascularisé, plus la distribution y est favorisée.

Pour le cerveau les antibiotiques non ionisés, liposolubles et de petite masse moléculaire, sont favorisés et peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique.

c. La biotransformation :

Les antibiotiques sont parfois modifiés dans l'organisme par les systèmes enzymatiques intestinaux, hépatiques ou rénaux. Les métabolites formés peuvent être inactifs et éliminés, ou être doués d'activités antibactériennes. Dans certain cas, la biotransformation au niveau intestinal a pour but d'activer l'antibiotique: lorsque l'antibactérien administré est sous forme de précurseur de l'antibiotique, on parle alors souvent de pro drogue (FMPMC, 2006). Le tableau X résume la pharmacocinétique de quelques antibiotiques.

d. L'élimination :

Elle peut être rénale ou hépatique :

- L'excrétion rénale se fait par filtration glomérulaire et sécrétion au niveau du tube contourné proximal avec parfois, possibilité de réabsorption tubulaire dépendante du pH urinaire.

Exemples d'antibiotiques excrétés par le rein : pénicillines, céphalosporines, aminosides, chloramphénicol.

- Au niveau hépatique, l'antibiotique est excrété par la bile avec possibilité de réabsorption intestinale par le biais du cycle entéro-hépatique.

Exemples d'antibiotiques éliminés par la bile : (ampicilline, rifamycine, macrolides)

- Il peut exister des excrétions par la salive ou les larmes, tels les macrolides (FMPMC, 2006).

Tableau X: Paramètres pharmacocinétiques de quelques antibiotiques

Antibiotiques	Absorption	Distribution	Elimination
Beta-lactamine Pénicilline	- Détruite par l'acidité gastrique (Administré une heure avant ou après repas.)	- Les pénicillines sont liées aux protéines plasmatiques à 60% - Diffusent facilement dans les espaces extracellulaires mais ne se concentrent pas dans les tissus.	- Rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. - La demi-vie d'élimination est généralement courte 30 minutes.
Macrolides Erythromycine	- Instabilité en milieu acide - Biodisponibilité médiocre selon le niveau de l'acidité gastrique.	- Molécules basiques et liposolubles. - Largement distribuées dans l'organisme. - Diffusent dans les tissus. - Diffusent aisément les membranes biologiques. - S'accumulent dans les compartiments cellulaires. - Se concentrent dans les tissus vascularisés.	- Biliaire après métabolisation hépatique. - l'érythromycine a une demi-vie courte.
Sulfamides	- Bien absorbés par voie orale.	- Diffusion dans les liquides interstitiels et le liquide céphalorachidien - Partiellement liés aux protéines plasmatiques	- Rénale, ce qui justifie leur utilisation dans le traitement des infections urinaires. - Une partie est préalablement métabolisée dans le foie.
Aminoglycosides Streptomycine	- Absorption orale est quasi nulle.	- Hydrophile. - Liaison aux protéines plasmatiques faible. - Pénètrent faiblement dans le liquide céphalo-rachidien. - Les cellules tubulaires proximales du rein et les cellules ciliées de la cochlée accumulent les aminoglycosides dont ils retiennent 5% de la dose administrée.	- Les aminoglycosides ne subissent aucune métabolisation, leur élimination est strictement rénale ($t_{1/2}$ 1.5h-3.5h)

Source : UCL: 05/08/2002

2.1.3.6. L'évaluation de l'activité des antibiotiques :

a. L'antibiogramme :

Le but de la réalisation d'un antibiogramme (Figure 2) est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques, dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique (Laure et *al*, 1995): bactérie sensible, bactérie intermédiaire, bactérie résistante.

On mesure le diamètre d'inhibition de chaque antibiotique (Figure 3), afin de déterminer la catégorie clinique de la bactérie à cet antibiotique testé (sensible, intermédiaire, résistant) et estimer la concentration minimale d'inhibition (CMI) (Girard et *al*, 2004).



Figure 2: Les zones translucides d'un antibiogramme



Figure 3: La lecture d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

CCI = c = concentration critique inférieure

CCS = C = concentration critique supérieure

D = diamètre critique supérieur

d = diamètre critique inférieur

b. La concentration minimale d'inhibition (CMI) :

C'est le paramètre le plus utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24 heures. Donc, la CMI explore seulement l'effet bactériostatique (Laure et *al*, 1995).

c. La concentration minimale bactéricide (CMB) :

Certains antibiotiques provoquent une mortalité bactérienne à partir d'une certaine concentration seuil. Cette bactéricidie s'effectue selon deux modalités (Laure, et *al*.; 1995).

- l'effet peut être proportionnel à la concentration d'antibiotique; on parlera alors de mortalité dépendante de la concentration ou "concentration dépendante"(Euzeby, 2005).
- l'effet est de type "tout ou rien" et la vitesse de mortalité est maximale dès que la concentration seuil de bactéricidie est atteinte. On parlera de mortalité dépendante du temps d'exposition ou "temps dépendant" (Euzeby, 2005).

2.1.3.7. L'association des antibiotiques :

Dans le but d'augmenter la bactéricidie, d'élargir le spectre antibactérien, voire de prévenir l'émergence de mutants résistants, les antibiotiques sont souvent utilisés en association afin :

- d'élargir le spectre d'activité dans les cas d'infections à germes multiples ;
- de traiter en urgence une infection grave non diagnostiquée ;
- de prévenir la sélection de mutants résistants lors des traitements de longue durée ;
- d'obtenir un effet synergique.

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

- indifférence : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre ;
- addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- synergie : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- antagonisme : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément (Burnichon ,2003).

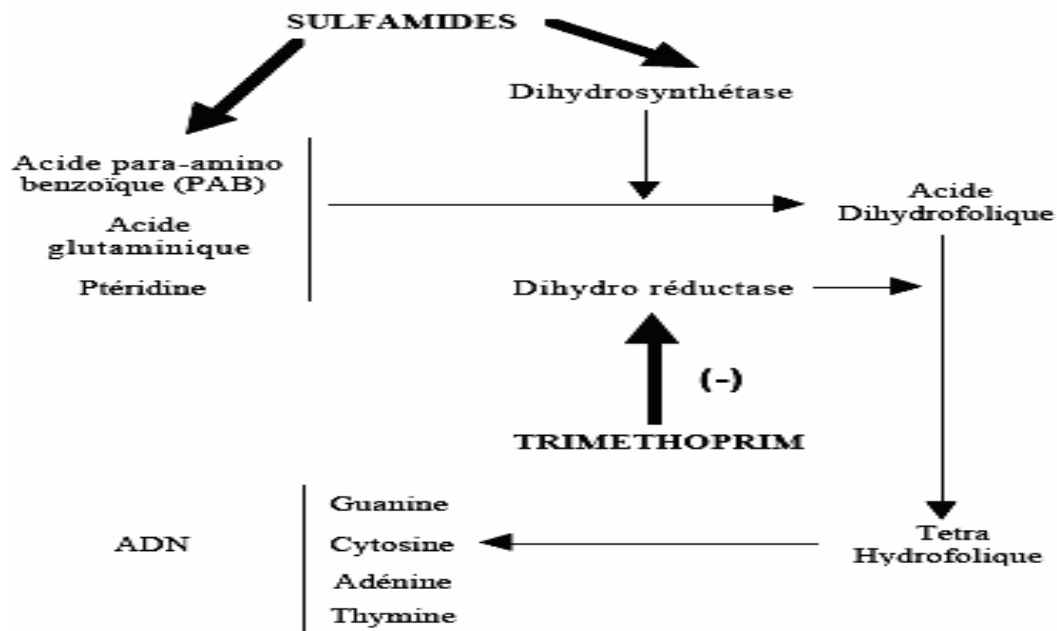
2.2. Les Sulfamides :

2.2.1. La définition:

Les sulfamides sont des anti-infectieux, doués de propriétés bactériostatiques à spectre relativement large. Ils sont en général, bien absorbés par voie orale et se distribuent largement dans tous les tissus, y compris dans le liquide céphalo-rachidien et synovial. Ils sont souvent associés à la triméthoprine en raison de leurs effets synergiques généralement dans un rapport de 5/1, ils deviennent fréquemment bactéricides et sont utilisés surtout dans le traitement des coccidioses (volailles, ruminants), ou des infections urinaires et digestives chez les carnivores (CBIPT, 2004).

2.2.2. Le mode d'action et métabolisme des sulfamides :

Les sulfamides sont des acides faibles qui agissent sur l'ADN car possédant une structure analogue à celles des molécules biologiques bactériennes. Ainsi, la cellule va les reconnaître et les intégrer dans son métabolisme; ils vont alors agir par inhibition compétitive à l'incorporation de l'acide para-amino-benzoïque (PABA) dans la synthèse d'acide folique. La cellule meurt par carence en bases nucléiques (CBIPT, 2004) (Figure 4).



Source : (CBIPT, 2004)

Figure 4: Mode d'action des sulfamides

3. Les risques présentés par l'usage des antimicrobiens :

Les risques d'usage d'antimicrobiens dans les élevages avicoles sont de deux types :

- présence des résidus dans les viandes,
- acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries.

3.1. La présence des résidus :

3.1.1. La définition de résidus :

Les résidus sont des substances pouvant apparaître dans les denrées alimentaires par suite à l'utilisation de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires. Il s'agit de traces indésirables de médicaments, de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci, dans le produit final. Parmi ces médicaments utilisés : les antimicrobiens (ACIA, 2005).

3.1.2. Les causes de la présence des résidus dans la viande :

Les médicaments vétérinaires, utilisés conformément au mode d'emploi, ne devraient pas entraîner la présence des résidus dans les viandes.

Les causes possibles de tels résidus sont :

- l'inobservation de la dose ou du mode d'emploi recommandés sur l'étiquette ;
- le non-respect des délais d'attente exigés;
- l'utilisation de matériel contaminé ou incorrectement nettoyé;
- la contamination de l'environnement (Chataigner et *al*, 2003).

3.1.3. Les préoccupations :

Bien que la contamination microbienne des aliments continue d'être la cause de la majorité des cas de maladie, l'inquiétude des consommateurs persiste concernant les résidus chimiques présents dans les aliments (Santé Canada, 2002).

La présence possible de résidus d'antibiotiques dans les viandes soulève des préoccupations, parmi lesquelles :

- les réactions allergiques chez les personnes sensibilisées. La pénicilline, qui cause les réactions indésirables les plus graves, est impliquée plus fréquemment que tous les autres antimicrobiens réunis;
- les résidus peuvent avoir des effets toxiques directs et aigus, tel le chloramphénicol qui est un antibiotique interdit depuis 1995 en Europe (SIMV, 2003);
- l'exposition à de faibles concentrations de certains composés chimiques sur des périodes prolongées pourrait entraîner une toxicité chronique. Cette préoccupation vise principalement les produits cancérigènes et ceux qui s'accumulent dans les organismes vivants, telle la furazolidone interdite depuis 1994 en Europe (Afssa, 2004).

3.2. L'acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries:

La résistance des bactéries à un antimicrobien est un mécanisme que la bactérie met en place pour neutraliser l'effet de l'antibiotique se trouvant dans son milieu de vie.

Il y'a deux types de résistance :

- une résistance naturelle;
- une résistance acquise.

3.2.1. La résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de la même souche. Elle est stable et possède un support génétique transmis à la descendance mais peu ou pas transmissible sur un mode horizontal.

Exemple: Les bacilles à gram négatif (Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*) sont naturellement résistants, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolide, rifampicine, vancomycine) parce que ces antibiotiques ne traversent pas la membrane externe de la paroi (Euzéby; 2005).

3.2.2. La résistance acquise :

La résistance acquise est due à l'acquisition d'information génétique exogène portées par des plasmides ou des transposons. Ces modifications du capital génétique permettront à la bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce.

La généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes (Biologie et recherche, 2003).

3.3 . Les modalités de résistance des bactéries :

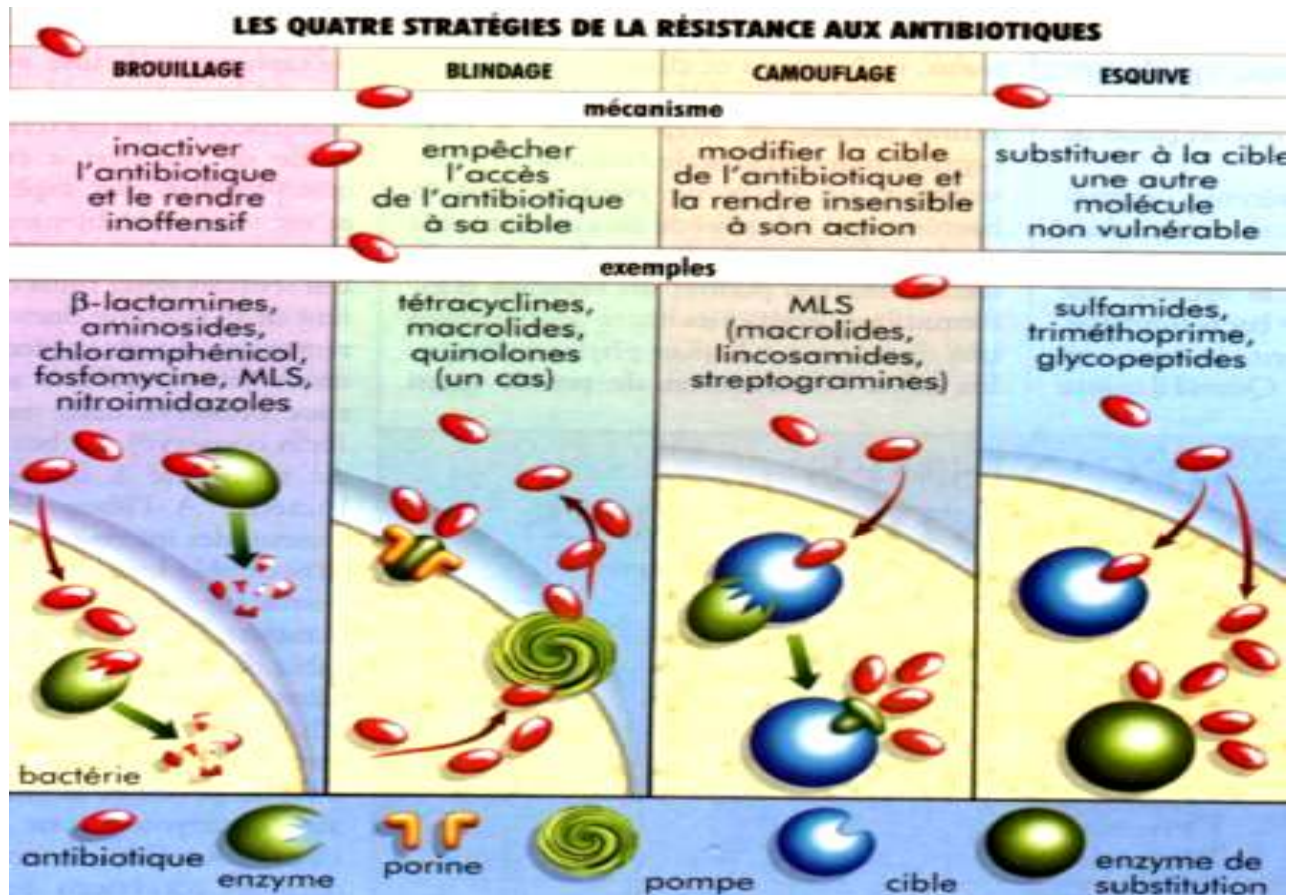
Pour contrer l'action des antibiotiques, les bactéries utilisent deux types de mécanismes :

- mécanismes biochimiques
- mécanismes génétiques

3.3.1. Les mécanismes biochimiques de résistance :

Il existe quatre stratégies qui sont de mieux en mieux connus. La figure 5 les illustre (Euzéby, 2005).

- a. **Le brouillage** : la bactérie synthétise des protéines (enzymes) pouvant séquestrer l'antibiotique ou le dégrader pour le rendre inoffensif (hydrolases, transférases). Ce brouillage peut se faire à l'extérieur de la cellule comme à l'intérieur (Euzéby, 2005).
- b. **Le camouflage** : la bactérie peut modifier la cible de l'antibiotique. Celle-ci n'est pas reconnue et lui devient insensible (Euzéby, 2005).
- c. **Le blindage** : la bactérie empêche l'accès de l'antibiotique aux cibles intracellulaires par deux modalités possibles (Euzéby, 2005).
 - modification de la perméabilité membranaire.
 - mise en place d'un système d'expulsion de l'antibiotique.
- d. **L'esquive** : la bactérie substitue une autre molécule à la cible. L'antibiotique, en se fixant sur ce leurre, ne remplit pas son rôle (Euzéby, 2005).



Source : <http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/images/image033.jpg>

Figure 5: Modalité de résistance chez la bactérie

3.3.2. Les mécanismes génétiques de résistance :

Les mécanismes de résistance sont parfois dus à l'existence de certains gènes qui, soit produisent des enzymes capables de dégrader les antibiotiques, soit sont responsables de modifications intracellulaires les rendant inopérants.

Ces gènes de résistance peuvent être portés sur le chromosome principal de la bactérie ou sur des entités génétiques appelées plasmides, transposons ou intégrons. Le transfert de gènes de résistance ne se fait pas seulement par transfert vertical, mais se fait principalement selon trois axes horizontaux (transformation, transduction et conjugaison). Ce transfert horizontal permet une diffusion extrêmement rapide des informations génétiques. La figure 6 schématise le réseau de transfert de la résistance à l'homme (SFM, 2006).

a. La transduction :

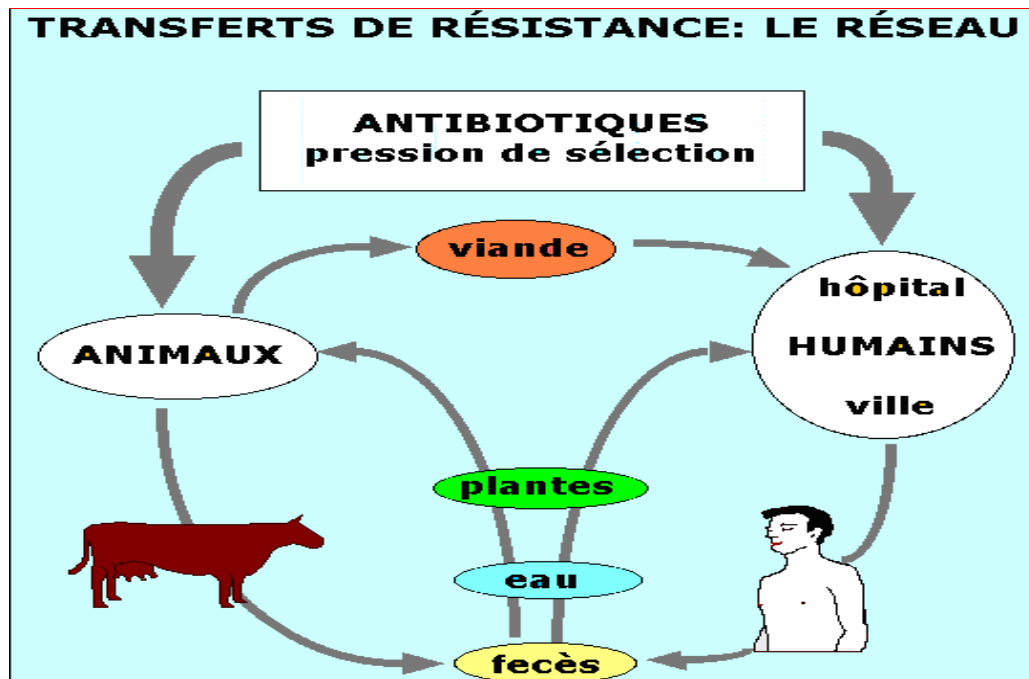
Dans la transduction, le vecteur permettant d'insérer un fragment d'ADN dans une cellule hôte est un bactériophage (virus bactérien). En se répliquant, le virus intègre son ADN à celui de la bactérie. Lorsqu'il la quitte, il emporte avec lui cet ADN contenant parfois quelques gènes de résistance. Comme le bactériophage attaque bon nombre de bactéries, il les transmettra à d'autres bactéries (SFM, 2006).

b. La transformation :

La transformation permet l'acquisition et l'intégration d'ADN nu. Cet ADN « libre » peut, par exemple, provenir d'une bactérie morte. Étant à l'extérieur il est alors capté par une autre bactérie et incorporé à son ADN. Si des gènes de résistance étaient présents dans l'ADN nu, ils pourront être transmis (SFM, 2006).

c. La conjugaison :

C'est le mécanisme le plus fréquent et le principal responsable des transferts horizontaux. L'ADN est transféré d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice par simple contact des membranes cellulaires.



Source : Faye, 2005

Figure 6: Réseau de transfert de résistance à l'homme

Chapitre I : Matériel :

Notre étude porte sur la recherche des résidus de quatre familles d'antibiotiques dans le muscle de poulet de chair : les bêta-lactamines (pénicilline G) ; les sulfamides (sulfadimirazine), les macrolides (érythromycine) et les aminosides (streptomycine).

Les analyses sont réalisées au sein du service bactériologique alimentaire et du service toxicologie, du Laboratoire Central de l'Intendance Militaire sis à El Harrach sur une période s'étalant de février à juillet 2006.

A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes :

- une méthode microbiologique : c'est une méthode officielle de contrôle utilisée dans les laboratoires belges (laboratoire de fougères). (Fabre., 2003).
- une méthode de chromatographie liquide haute pression : méthode utilisée dans les laboratoires de L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) (Fabre., 2003).

1. Le matériel de la méthode microbiologique:

1.1 . Le matériel biologique :

1.1.1. La viande blanche :

Un seul type de viande a fait l'objet de notre étude. Il s'agit de viande blanche de volaille type « poulet de chair », composée de 30 échantillons provenant d'une tuerie privée située à la commune de Hammadi, wilaya de Boumerdes.

1.1.1.1. L'origine des échantillons :

Les 30 échantillons sont issus d'un élevage privé situé dans la région de Bouira, composé de 2500 sujets. Le poids total des 30 échantillons est égal à 76 Kg, soit une moyenne de 2,5 Kg /sujet.

1.1.1.2. Le prélèvement des échantillons :

Nos prélèvements sont réalisés en deux étapes :

- première étape : juste après l'abattage, prélever **30** carcasses de poulet de chair entières, les placées dans un congélateur puis les transportées au laboratoire.
- deuxième étape : à l'aide d'un matériel stérile (pince, couteau), prélever **500 g** de muscle du bréchet, mettre dans des sacs stériles et conserver ensuite dans le congélateur.

1.1.2. les micro-organismes utilisés :

Pour rechercher les quatre familles d'antibiotiques, notre travail nécessite l'utilisation des micro-organismes suivant (Tableau XI).

- **Bacillus subtilis** (Ref : BGA 935/2) Température d'étuvage (+ 30° C).
- **Micrococcus luteus** (Ref : TCCA 697/2) Température d'étuvage (+ 37° C).

Tableau XI: Familles d'antibiotiques tests en fonction des souches et du pH du milieu

Micro-organisme	pH du milieu	Antibiotiques recherchés
Bacillus subtilis	6,0	Béta-lactamine Tétracycline
	7,2	Sulfamides
	8,0	Aminosides
Micrococcus luteus	8,0	Béta-lactamine Macrolide

1.2. Les produits chimiques et réactifs :

1.2.1. Les milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation de notre recherche sont :

- **Test agar à pH 6** : c'est un milieu solide, utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques à caractère légèrement acide tels les bêta-lactamines et les tétracyclines.
- **Milieu Mueller-Hinton à pH 7,2**: c'est un milieu solide, utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques à caractère neutre tels les sulfamides.
- **Milieu Mueller-Hinton à pH 8** : nous avons utilisé la potasse (KOH) pour ajuster le milieu Mueller-Hinton à **pH 7,2** afin d'avoir un milieu à **pH 8**, permettant la recherche des germes sensibles aux antibiotiques à caractère légèrement basique.
- **Bouillon tripticase soja** : C'est une gélose utilisée pour préparer le bouillon de culture des germes exigeants.

1.2.2. Les réactifs :

- **La potasse** : KOH pour ajuster le **pH 7,2** du milieu Mueller-Hinton à **pH 8**.

1.2.3. Les antibiotiques :

Les antibiotiques utilisés, été sous deux formes :

- Trois antibiotiques sous forme de disque:
 - Pénicilline G sodique, 10 UI
 - Erythromycine, 15 UI
 - Sulfamide, 250 µg
- Deux antibiotiques sous forme déshydratée à usage de laboratoire:
 - Dihydro-streptomycine ref : EC 226-823-7
 - Triméthoprine ref : T 7883

1.3. L'appareillage : Voir annexe (1)

2. Le matériel de la méthode chromatographique :

L'analyse chromatographique est réalisée sur un appareil équipé d'un détecteur UV visible pour quantifier la concentration des résidus d'antibiotiques identifiés avec la méthode microbiologique.

2.1 . L'appareillage :

- Tubes à centrifuger
- Fioles jaugées en verres
- Agitateur pour tubes à essai, type vortex
- Centrifugeuse
- Broyeur (Hachoir)
- Balance de précision
- Cuve à ultrason
- Pipettes automatiques
- Tubes à essai
- Entonnoir
- Pipette graduée
- Micro seringue

2.2 . Les réactifs :

Les produits chimiques et les solvants utilisés sont des réactifs de qualité appropriée pour l'analyse. Durant toute l'expérimentation, nous avons utilisé une eau bidistillée.

Les solutions nécessaires au traitement des échantillons sont préparées avec les produits chimiques suivants:

- | | |
|---|---------|
| - Acétonitrile | Merck |
| - Méthanol | Merck |
| - Acide trichloracétique | Prolabo |
| - Acide oxalique dihydraté | Prolabo |
| - Acide citrique monohydraté | Merck |
| - Hydrogénophosphate disodique anhydre | Merck |
| - Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) | Prolabo |
| - Sel disodique dihydraté | Prolabo |
| - Poudre florisil | Prolabo |

Chapitre III : Les méthodes de dépistage des résidus :

Malgré le nombre croissant de méthodes analytiques disponibles pour détecter les résidus d'antimicrobiens dans l'alimentation humaine, on note l'absence de techniques rapides, fiables et automatisées dans les laboratoires d'analyses. La gestion des résidus chimiques dans les aliments d'origine animale est une vieille problématique basée sur des tests d'inhibition microbiens (sensibilité insuffisante) et nécessitant des temps d'incubation très long. D'autres méthodes plus sensibles ont été développées en alternative (les tests immunologiques) mais leurs reproductibilités et automatisations sont faibles (Maghuin et *al.* ; 2001) .

En conséquence, le développement de méthodologies analytiques appropriées reste d'actualité (Gateman, 2004).

Trois problèmes majeurs se posent lors de l'analyse des résidus d'antibiotiques :

- absence de méthodologie de dosage commune aux antibiotiques en raison de leur différence de structure.
- les matrices d'intérêts sont très complexes et variées (ex : muscles, graisse, lait, reins).
- les méthodes doivent être quantitatives car les teneurs en résidus sont réglementées par des LMR qui varient énormément selon les substances et les matrices (Edder, 2002).

Parmi ces méthodes, nous avons :

1. La méthode microbiologique :

1.1 . La diffusion sur gélose :

Elle est qualitative, basée sur la diffusion des antibiotiques contenus dans un échantillon de viande (ou dans d'autres produits alimentaires d'origine animale), au contact d'un milieu gélosé (tryptophane soja) préalablementensemencé dans la masse par une suspension d'une souche sensible. Le milieu est incubé à la température idéale de la souche test. Une inhibition de la croissance de cette souche traduit la présence d'antibiotiques (Guiraud, 1998).

Cette méthode sera développée dans notre partie expérimentale.

1.2 . La technique en milieu liquide (Méthode d'acidification) :

Elle est utilisée essentiellement pour la recherche de résidus d'antibiotiques dans le lait après pasteurisation (Multon, 1991).

2. La méthode immunologique :

Il existe plusieurs tests immunologiques rapides qui détectent les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires.

2.1 . Radio Immuno Assay (Tests RIA):

C'est la reconnaissance de la molécule par un anticorps marqué avec un isotope radioactif. Avec cette technique, on mesure la radioactivité liée aux anticorps après avoir éliminé la radioactivité libre.

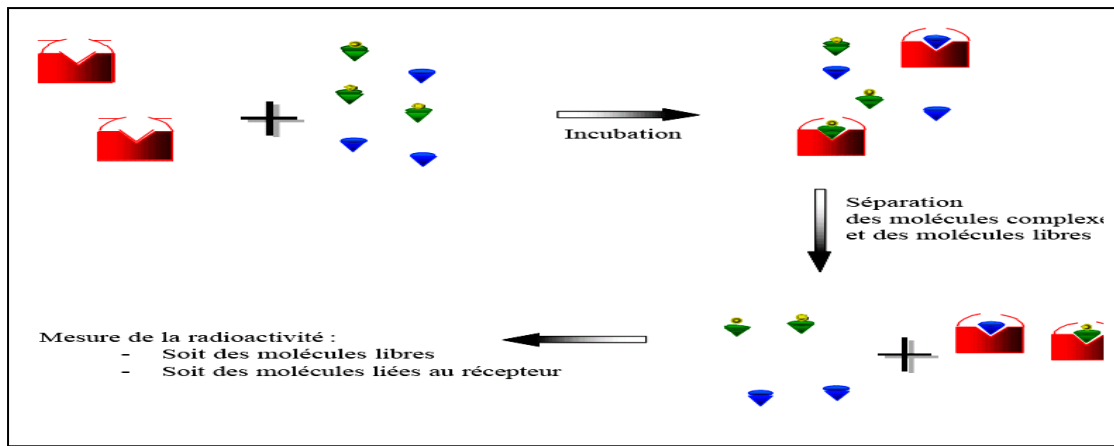
Ces méthodes permettent de détecter des concentrations en résidus de l'ordre du ppb (microgramme par kg) dans les échantillons de lait, de viandes, dans les oeufs et dans les fluides biologiques (Maghuin. R, 2005).

2.2 . Radio Récepteur Assay (RRA) :

Cette fois l'antigène est marqué par une enzyme dont l'activité liée aux anticorps peut être mesurée grâce à une coloration correspondant à la transformation du substrat de l'enzyme en produit. Cette méthode permet de détecter les β lactames, les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides et le chloramphénicol dans les échantillons de lait, de viandes, dans les oeufs et dans les fluides biologiques. La figure 7 en résume le principe.

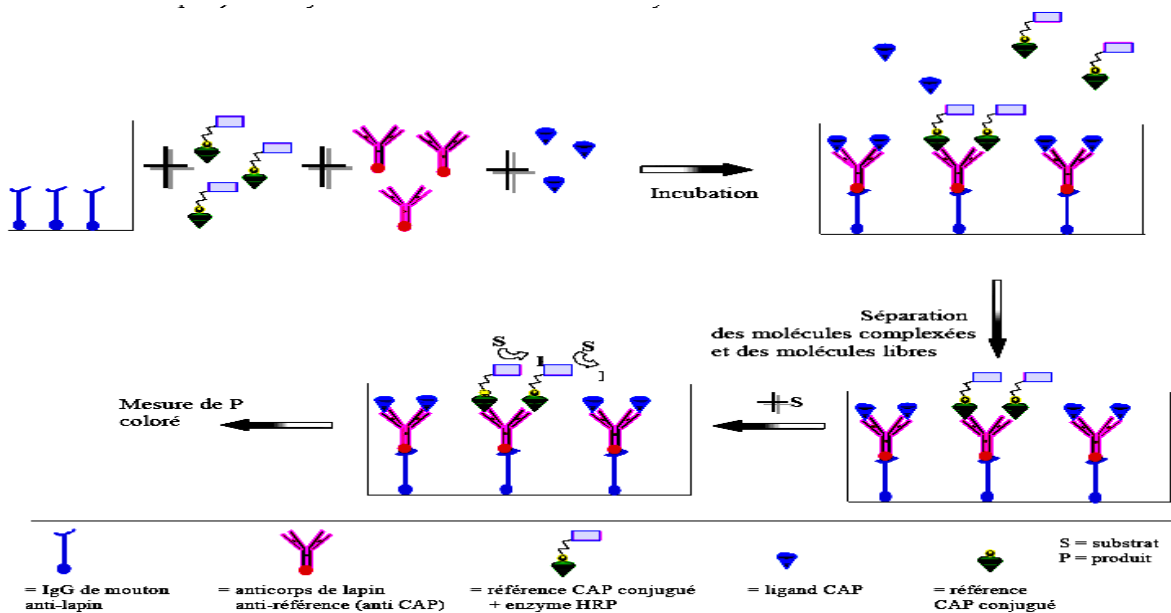
2.3 . Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):

Le test ELISA se base sur le même principe que le RIA, mis à part le fait que le marquage est enzymatique au lieu d'être radioactif. Les résultats finaux obtenus sont basés sur un changement de couleur (Maghuin et al, 2001) (Figure 8).



Source : (Maghuin et al, 2001)

Figure 7: Principe du Radio Immuno Assay et du Radio Récepteur Assay



Source : (Maghuin et al, 2001)

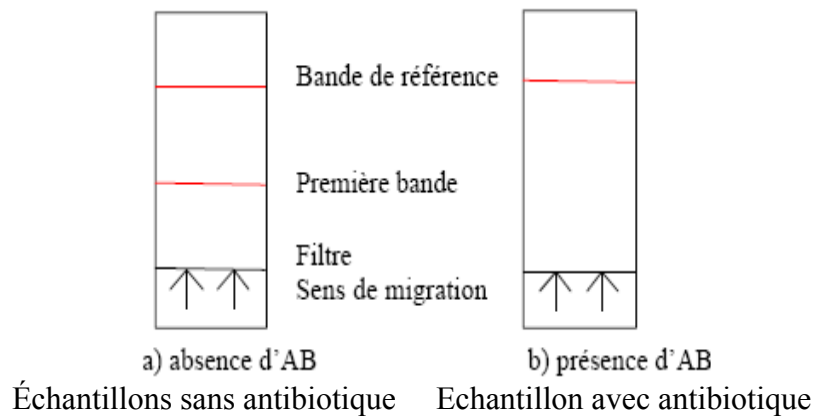
Figure 8: Principe Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

2.4 . Le test Penzym :

C'est un test qualitatif se basant sur une réaction enzymatique et colorimétrique. Très utilisé dans l'analyse du lait, il ne peut être pratiqué tel quel pour le jus de viande. En effet, ce dernier, se basant sur une réaction colorimétrique, il est nécessaire de décolorer totalement la solution d'extrait viande (Maghuin et al., 2001).

2.5 . Le test β -STAR :

Il est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Au cours de la première incubation, les antibiotiques du type β -lactames présents dans l'échantillon se lient au récepteur. Pendant la deuxième incubation, l'échantillon migre sur un support immuno-chromatographique présentant deux bandes de capture. La première bande retient tous les récepteurs non liés aux antibiotiques et la seconde permet de contrôler le bon déroulement du test (bande de référence). Plus il y aura d'antibiotiques présents dans l'échantillon, moins il y aura de récepteurs libres susceptibles de migrer sur le support et donc, la première bande de capture sera moins visible (Maghuin et *al*, 2001). (Figure 9)



Source : (Maghuin et *al*, 2001)

Figure 9: Principe du B-STAR 100

3. La méthode physico-chimique :

3.1 . La chromatographie liquide haute pression (HPLC)

C'est une technique d'identification et de quantification permettant la séparation des molécules analysées. Elle est fréquemment utilisée en biochimie ainsi qu'en chimie analytique (Maghuin. et *al*, 2001). C'est la deuxième méthode que nous avons utilisée dans notre partie expérimentale; elle sera développée ultérieurement.

Chapitre II : Méthodes :

1. La méthode microbiologique :

Pour la méthode microbiologique, nous avons appliqué le test des quatre boîtes sur gélose.

1.1 . Le but :

Identifier les résidus de quatre antibiotiques suivant : pénicilline G, streptomycine, érythromycine, sulfadimirazine.

1.2 . Le principe :

- ensemencer les micro-organismes test dans des milieux nutritif à pH (6.0 ; 7.2 ; 8.0) ;
- déposer des disques d'échantillon de muscle congelé à la surface du milieu ensemencé ;
- incuber les boîtes de pétri ; la substance a activité antibiotique éventuellement présente dans les disques d'échantillon, diffuse concentriquement sur la gélose et inhibe la croissance des micro-organismes test. Il en résulte la formation d'une zone d'inhibition translucide autour de l'échantillon.

1.3 . L'application :

1.3.1. La remise en activité des micro-organismes test :

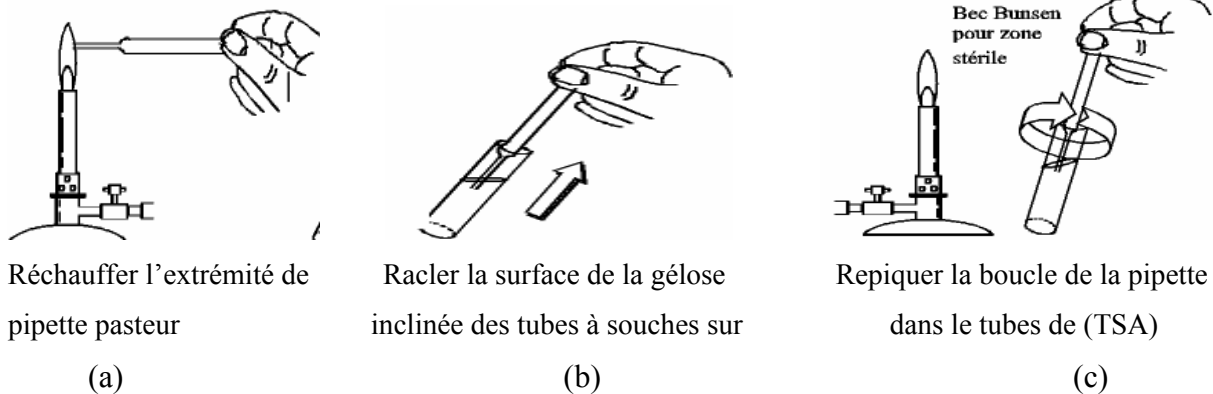
Mettre 5 ml de bouillon nutritif trypticaseine soja (TSA) dans deux tubes stériles. A l'aide d'une anse en acier, on fait des raclages à la surface de la gélose inclinée d'un tube contenant des spores de *Bacillus subtilis*. Repiquer ensuite la boucle de cette anse dans le premier tube contenant 5 ml de TSA et tourbillonner avec l'agitateur (Figure 10).

Refaire la même opération pour *Micrococcus luteus* en utilisant une autre pipette pasteur et la repiquer dans le deuxième tube.

Procéder à l'incubation des deux tubes dans les étuves correspondantes:

- Tube *Bacillus subtilis* à (+30° C) pendant 24h
- Tube *Micrococcus luteus* à (+37° C) pendant 18h

Ces cultures représentent les solutions mères.



Source: www.georges.dolisi.free.fr

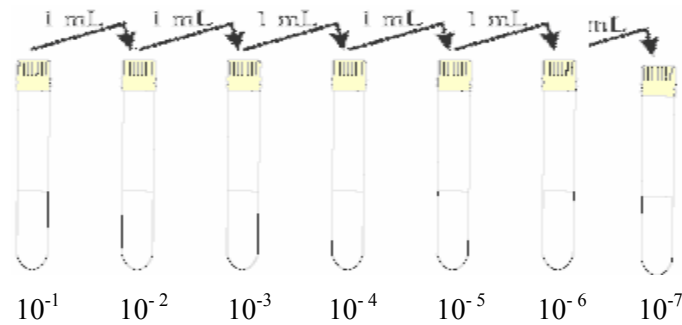
Figure 10: Les étapes de l'activation des souches

1.3.2. La préparation de l'inoculum :

Elle permet d'avoir une culture d'épreuve en réalisant une série de dilution (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7}) des solutions mères à souches préparées auparavant.

1.3.2.1. Les dilutions des solutions mères :

- Faire une rangée de sept (7) tubes stériles pour réaliser les dilutions de *Bacillus subtilis*.
- Ecrire la souche et la dilution sur chaque tube,.
- Pipeter 9 ml d'eau physiologique dans les 7 tubes.
- Pipeter 1 ml de la solution mère de *Bacillus subtilis* dans le premier tube de la rangée qui correspondra à la dilution de 10^{-1} de la solution mère de *Bacillus subtilis*.
- A l'aide d'une nouvelle pipette graduée, transférer 1 ml de la première dilution 10^{-1} de la solution mère de *Bacillus subtilis* dans le deuxième tube. On aura une dilution de 10^{-2} .
- Poursuivre la même opération pour les autres tubes jusqu'à atteindre la dilution 10^{-7} de la solution mère de *Bacillus subtilis*. (Figure 11).
- Refaire la même opération pour la solution mère de *Micrococcus luteus*.



Tubes de diluant de 9 ml d'eau physiologique

Source: www.georges.dolisi.free.fr

Figure 11: Les dilutions de la solution mère de BS pour la recherche de l'inoculum

1.3.2.2. L'ensemencement des dilutions sur gélose Triptocaseine soja :

- Prendre les 7 tubes de la première rangée des dilutions de *Bacillus subtilis*.
- Prendre une série de 7 boîtes de pétri, y inscrire sur le verso:BS et la dilution correspondante.
- Pipeter 1 ml de chaque tube de la rangée de *Bacillus subtilis* dans la boîte de pétri correspondante puis verser 15 ml de TSA dans les sept boîtes de pétri.
- Refaire la même opération pour *Micrococcus luteus*.
- Incuber les boîtes de pétri dans les étuves:
 - Boîte de pétri de *Bacillus subtilis* à (+30° C) pendant 24h.
 - Boîte de pétri de *Micrococcus luteus* à (+37° C) pendant 16h à 18h.

1.3.2.3. Le dénombrement :

Faire la lecture des boîtes de pétri, pour chercher la dilution de l'inoculum à densité de 10^5 spores /ml.

- o Pour *Bacillus subtilis*, nous avons utilisé à la place de l'inoculum préparé; une ampoule de 1 ml contenant 10^6 colonies, dans un litre de gélose.
- o Pour *Micrococcus luteus*, l'inoculum correspond à la dilution 10^{-1} .

1.3.3. La recherche de résidus d'antibiotiques dans le muscle :**1.3.3.1. La préparation des géloses : Voir annexe (2)**

- Test agar à pH 6
- Mueller Hinton à pH 7,2
- Mueller Hinton à pH 8

1.3.3.2. La préparation des solutions d'antibiotiques témoins :

Nous avons préparé uniquement deux solutions d'antibiotiques (Triméthoprine, Dihydrostreptomycine), les autres antibiotiques ayant été conditionnés sous forme de disque.

1.3.3.2.1. La préparation de la solution Triméthoprine :

- Dissoudre 50 mg de Triméthoprine dans 5ml d'acide acétique à 5%.
- Ajuster avec 500 ml d'eau distillé : c'est la solution mère. Peut être conservé 14jours, à (+4° C).
- Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère à 1/20. La concentration finale sera de 0,005 mg / ml.

1.3.3.2.2. La préparation de la solution Dihydrostreptomycine :

- Dissoudre 64 mg de Dihydrostreptomycine dans 50ml d'eau distillé.
- Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère à 1/200. La concentration finale sera de 0,0064 mg / ml.

1.3.3.3. La préparation des boîtes de Pétri :

- Prendre 0,2 ml (l'inoculum) de l'ampoule de *Bacillus subtilis* (10^6 / l de gélose), l'ajouter aux 200 ml de gélose à pH 6,0.
- Prendre 0,2 ml (l'inoculum) de la même ampoule de *Bacillus subtilis*, la rajouter aux 200 ml de gélose à pH 7,2. Ajouter 10 µl de la solution de triméthoprimine pour la détection des sulfamides grâce à la synergie triméthoprimine-sulfamides.
- Prendre 0,1 ml (l'inoculum) de la même ampoule de *Bacillus subtilis*, l'ajouter aux 100 ml de gélose à pH 8,0.
- Prendre 1 ml de l'inoculum de *Micrococcus luteus* (dilution 10^{-1}), et l'ajouter à 150 ml de gélose à pH 8,0.
- Agiter les flacons et réaliser rapidement l'étape suivante pour éviter la solidification des géloses.
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 6,0 dans les boîtes de Pétri identifiées par leur verso (BS, pH 6).
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 7,2 dans les boîtes de pétri identifiées par leur verso (BS, pH 7,2).
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 8,0 dans les boîtes de pétri identifiées par leur verso (BS, pH 8,0).
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 8,0 dans les boîtes de pétri identifiées par leur verso (ML, pH 8,0).

1.3.3.4. Le traitement des échantillons :

- Retirer les échantillons du congélateur, les déposer sur un plateau en acier inoxydable.
- Faire des raclages à la surface du muscle pour éliminer les impuretés.
- Prélever, à l'aide d'un emporte-pièce sur le premier échantillon de muscle, une carotte cylindrique de 8mm de diamètre et 2cm de long environ.
- Pousser le cylindre de muscle du premier échantillon hors de l'emporte-pièce; découper avec une lame de bistouri huit rondelles de 2mm d'épaisseur.
- A l'aide d'une pince, placer deux rondelles du premier échantillon en position diamétralement opposées sur chaque boîte de pétri (3 boîtes de pétri pour *Bacillus subtilis* à pH 6,0; pH 7,2; pH 8,0 ; et une boîte pour *Micrococcus luteus* à pH 8,0).
- Stériliser l'emporte-pièce à la flamme et refaire la même opération pour les autres échantillons de telle sorte à avoir deux échantillons par boîte de pétri (Figure12).
- Tous ces disques doivent se situés à 1 cm de la périphérie de la boîte.
- Placer les disques d'antibiotiques au milieu des boîtes de pétri, selon le pH.
- Incuber les boîtes de pétri dans les étuves :
 - *Bacillus subtilis* à 30° C pendant 24h
 - *Micrococcus luteus* à 37° C pendant 18 h.
- Faire la lecture des boîtes pour voir les zones d'inhibition



Figure 12: Disposition des échantillons sur la boîte de Pétri

2. La méthode chromatographique :

Elle permet l'identification et le dosage des antibiotiques détectés avec la méthode microbiologique. La limite de détection a été validée à 25µg /Kg. D'après le Règlement fixées par CEE n° 2377/90 du Conseil du 4 mars 1999, la limite maximale de résidus dans le muscle pour la pénicilline G (LMR) est fixée à 50µg/Kg, et pour l'érythromycine, à 100µg/Kg d'après le règlement CEE n° 2377/90 du Conseil du 27 octobre 2000 (Maghuin et al, 2001).

2.1. La préparation des solutions :

2.1.1. La préparation des solutions pour traiter les échantillons :

- Solution acide trichloracétique 1g/ml :
Dissoudre 50g dans 50 ml d'eau ultra pure.
- Solution aqueuse d'acide oxalique dihydraté 0,01mol / l :
Dissoudre 1,26g dans 1 litre d'eau ultra pure.
- Solution d'acide oxalique dihydraté 0,01mol /l de méthanol :
Dissoudre 1,26g dans 1litre de méthanol.
- Solution d'acide citrique monohydraté 21g/ml :
Dissoudre 21g dans un litre d'eau ultra pure.
- Solution hydrogénophosphate disodique anhydre 28,4mg/ml :
Dissoudre 28,4 g dans un litre d'eau ultra pure.
- Préparation d'une solution tampon Mac Ilvain :
Mélanger un litre de la solution d'acide citrique avec 625ml de la solution d'hydrogénophosphate disodique anhydre puis ajuster le pH à 4.
- Solution tampon Mac Ilvain/ EDTA :
Ajouter 60,5g d'EDTA au 1,625 ml de tampon Mac Ilvain de manière à obtenir une solution contenant 0,1 mol d'EDTA.

2.1.2. La préparation des solutions étalons d'antibiotiques :**2.1.2.1. La préparation de la solution mère de Pénicilline G 100µg/ml :**

Dissoudre 1mg de Pénicilline G dans 10 ml de méthanol pour préparer des solutions étalons filles à des concentrations variées. Les solutions préparées sont :

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 20µg /ml :

Pipeter 0,2 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 15µg /ml :

Pipeter 0,15 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 10µg /ml :

Pipeter 0,1 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 05µg /ml :

Pipeter 0,05 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 10ml et ajuster le volume avec du méthanol.

2.1.2.2. La préparation de la solution mère d'érythromycine 100µg/ml :

Ajouter 1mg d'érythromycine en poudre à 10 ml de méthanol.

o La solution étalon fille d'érythromycine 20µg /ml

Pipeter 0,2 ml de la solution mère d'érythromycine dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

2.2. La préparation des échantillons :

Pour la préparation des échantillons, nous avons suivi trois étapes :

2.1.1. L' extraction :

- Placer 5g de muscle haché dans un tube à centrifuger.
- Ajouter 25 ml de Tampon Mac Ilvain/ EDTA et agiter pendant 30 secondes.
- Agiter 15 minutes avec un agitateur rotatif puis centrifuger 10 minutes.
- Récupérer le surnageant.

2.1.2. La déprotéinisation :

- Prendre le surnageant dans un Becher, ajouter 2,5ml d'acide trichloroacétique à 1g /ml.
- Placer un barreau aimanté dans le Becher et déposer celui-ci sur l'agitateur magnétique pendant une minute.
- Verser le contenu du Becher dans un tube pour une centrifugation.
- Récupérer l'extrait.

2.1.3. La purification :

- Conditionner la cartouche bond-élué avec 1ml de méthanol puis 1ml d'eau ultra pure et en dernier avec 1ml de tampon Mac Ilvain / EDTA.
- Boucher le robinet de la cartouche avec du coton pour éviter la sortie de la poudre.
- Placer 25 g de la poudre FLORISIL dans la cartouche et la déposer sur un support.
- Verser l'extrait dans la cartouche et régler le robinet (débit de 1 à 2 gouttes par seconde).
- Laver la cartouche avec 1ml d'eau ultra pure et la sécher à l'aide d'une pompe à vide pendant 5 minutes.
- Eluer lentement la cartouche avec 1ml de la solution à 0,01mol/l d'acide oxalique méthanolique puis 1ml d'eau ultra pure. Récupérer l'éluat
- Transférer 1ml de l'éluat du premier échantillon dans le micro tube.
- Idem pour les autres échantillons.
- Conserver les micro tubes au frais et à l'abri de la lumière.

2.2. L'injection de l'éluât dans HPLC :

L'analyse a été effectuée par un chromatographe liquide à haute performance comprenant un détecteur UV. La séparation est faite sur une colonne Spherob ODS-C18, avec un débit de phase mobile de 0,8ml/min. La phase mobile est composée d'acétonitrile dégazifié (prendre le flacon de 600 ml d'acétonitrile, le placer dans un bac ultrason durant une heure). Le volume d'injection de l'échantillon est de 20µl. L'étalon de la pénicillineG est injecté à une longueur d'onde de 325 nm et l'étalon érythromycine à une longueur d'onde de 287 nm, selon les normes internationales.

L'ordre d'injection est le suivant :

- Le solvant méthanol.
- Pénicilline G étalon à 20µg/ml.
- Rinçage avec le solvant méthanol.
- Les échantillons (faire des rinçages au solvant après chaque échantillon injecté afin d'éviter les contaminations).
- Rinçage avec le solvant méthanol.
- Erythromycine étalon à 20µg/ml.

2.3. La quantification des concentrations de résidus :

2.3.1. La quantification de pénicilline G présente dans les échantillons :

La concentration de la solution étalon choisie est de 20µg/ml. Nous avons injecté 20µl de cette solution et nous avons obtenu un pic dont la surface est égale à **330,25**.

Pour calculer les concentrations de résidus de Pénicilline G présents dans les échantillons, nous avons procédé de la manière suivante :

- Calculer la concentration de la Pénicilline G (**X**) présente dans 20µl de la solution étalon injecté dans HPLC :

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Solution étalon: } 20 \mu\text{g} & \text{-----} > & 1 \text{ ml} \\
 2 \mu\text{g} & \text{-----} > & 100 \mu\text{l} \\
 \mathbf{X} & \text{-----} > & 20 \mu\text{l}
 \end{array}
 \quad
 \boxed{\mathbf{X} = 0,4 \mu\text{g}}$$

- Calculer la concentration (**Y**) de la Pénicilline G présente dans 5g de muscle du premier échantillon **E₁**, à partir de la surface de sa courbe (pic) et de la concentration de Pénicilline G calculé (**X= 0,4µg**) avec la surface de sa courbe .

$$\begin{array}{rcl}
 0,4 \mu\text{g (Péni G étalon)} & \text{-----} > & 330,25 \text{ (surface du pic de Péni G étalon).} \\
 \mathbf{Y} & \text{-----} > & 503,77 \text{ (surface pic du } \mathbf{E_1})
 \end{array}$$

$$\boxed{\mathbf{Y} = 0,601 \mu\text{g} / 5\text{g}}$$

- Calculer la concentration du premier échantillon [**E₁**] dans un kilogramme de muscle :

$$\begin{array}{rcl}
 0,601 \mu\text{g} & \text{-----} > & 5\text{g} \\
 [\mathbf{E_1}] & \text{-----} > & 1000\text{g}
 \end{array}
 \quad
 \boxed{[\mathbf{E_1}] = 122 \mu\text{g} / \text{kg}}$$

Procéder de la même manière pour calculer la concentration des autres échantillons.

2.3.2. La quantification d'érythromycine présente dans les échantillons :

La surface obtenue après l'injection de 20 µl de la solution étalon d'érythromycine (20 µg/ml) est **S = 710,80**.

- Chercher la concentration d'érythromycine dans 20 µl de la solution étalon :

$$\begin{array}{lcl} 20\mu\text{g} & \text{-----}> & 1000\ \mu\text{l} \\ X & \text{-----}& \rightarrow 20\ \mu\text{l} \end{array} \quad \quad \quad \mathbf{X = 0,4\ \mu\text{g}}$$

- Quantifier l'érythromycine dans 5g de l'échantillon₁₅ dont la surface est S₁₅ = 420,3

$$\begin{array}{lcl} 0,4\ \mu\text{g} & \text{-----}> & 710,80. \\ H & \text{-----}& > 420,3 \end{array} \quad \quad \quad \mathbf{H = 0,236\mu\text{g} / 5g}$$

- Quantifier l'érythromycine dans un kilogramme :

$$0,236\mu\text{g} \times 1000\text{g} / 5\text{g} = 47,3\mu\text{g}$$

La concentration d'érythromycine dans E₁₅ = **47,3 µg/Kg**

Chapitre III : Les résultats

1. Les résultats de la méthode microbiologique :

On débute par la lecture des antibiotiques témoins, afin de vérifier la conformité des souches test utilisées et de voir également si notre procédé est concluant lors de l'apparition d'une zone annulaire translucide correspondant à la zone d'inhibition (Tableau XII).

Tableau XII: Les diamètres d'inhibition des antibiotiques témoins

Espèce	pH	Antibiotiques	Diamètre de la zone d'inhibition
Bacillus subtilis	6,0	Pénicilline G	20 mm
	7,2	Sulfadimirazine	18 mm
	8,0	Streptomycine	23 mm
Micrococcus luteus	8,0	Erythromycine	25 mm

Par la suite, on procède à la lecture des boîtes de pétri des échantillons. Sont considérés comme positifs, les échantillons de muscle présentant des zones d'inhibition supérieures ou égales à 2mm (Fabre; 2003) selon les normes internationales. Ceux qui présentent des zones d'inhibitions inférieures à 2mm, sont considérés comme des échantillons négatifs.

Sur les 30 échantillons analysés, deux échantillons seulement (les numéros 10 et 15) ont présenté des zones d'inhibition supérieures à 2mm. Nous avons remarqué que l'échantillon 15 avait des zones d'inhibition sur deux milieux. Les deux échantillons (10 et 15) sont considérés alors comme positifs, soit 6,66% et les 28 autres échantillons, sont considérés comme négatifs, soit 93,33 % (cf. Tableau XIII et figure 13).

Tableau XIII: Nombre d'échantillons positifs aux antibiotiques tests

Nombre total d'échantillons	Nombres d'échantillons positifs aux antibiotiques test			
	Pénicillines pH 6,0	Sulfamides pH 7,2	Streptomycines pH 8,0	Erythromycines pH 8,0
30	02	0	0	1

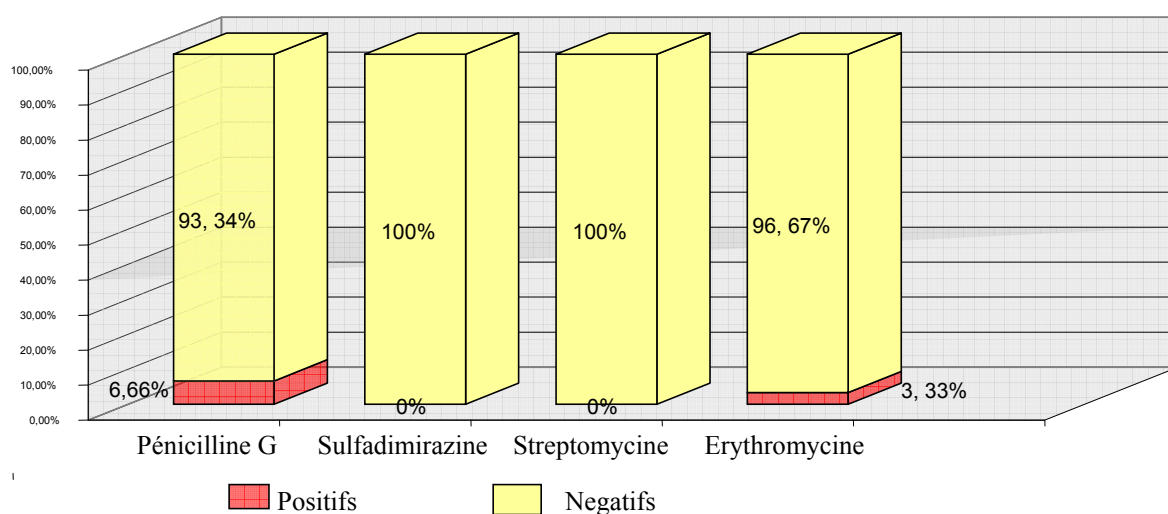


Figure 13: Résultats de la méthode microbiologique

Bacillus subtilis pH 6,0 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, deux (02) seulement sont positifs à la pénicilline G, soit 6,66%. Ces deux échantillons ont présenté des zones annulaires comprises entre 04 et 07mm; ils sont donc considérés comme positifs à la pénicilline G (Tableau XIV).
- Les vingt-huit (28) échantillons restants, soient 93,34% n'ont pas présenté de zones annulaires; ils sont considérés comme négatifs à la pénicilline G (Tableau XV).

Bacillus subtilis pH 7,2 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, aucun échantillon n'a présenté de zone annulaire; ils sont alors considérés comme négatifs à la sulfadimirazine.

Bacillus subtilis pH 8,0 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, aucun n'a encore présenté de zone annulaire; ils sont donc considérés comme négatifs à la streptomycine.

Micrococcus luteus pH 8,0 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, l'échantillon (**E₁₅**) a présenté une zone annulaire de 05mm soit 3,33%. Il est considéré comme positif à l'érythromycine, rappelons que ce même échantillon est positif à la pénicilline (Tableau XIV).
- Les vingt-neuf (29) restants (soit 96,67%) n'ont pas présenté de zones annulaires. Ils sont considérés comme négatifs à l'érythromycine (Tableau XV).

Tableau XIV: Diamètre des zones annulaires des échantillons positifs

Echantillons Positifs	Zone annulaire des échantillons positifs aux antibiotiques test en millimètres					
	Pénicillines pH 6,0		Sulfamides pH 7,2	Streptomycines pH 8,0	Erythromycines pH 8,0	
E 10	06mm	07mm	-	-	-	
E 15	05mm	04mm	-	-	05mm	05mm

Tableau XV: Résultats de la méthode microbiologique

Espèce	pH	Antibiotiques	Pourcentage d'échantillons	
			Positif	Négatif
Bacillus subtilis	6,0	Pénicilline G	6,66%	93,34%
	7,2	Sulfadimirazine	0%	100%
	8,0	Streptomycine	0%	100%
Micrococcus Luteus	8,0	Erythromycine	3,33%	96,67%

2. Les résultats de la méthode chromatographique :

Nous avons recherché les deux antibiotiques détectés avec la méthode microbiologique.

1.2.1. Les résultats de la pénicilline G par HPLC :

1.2.1.1. Le résultat de la pénicilline G étalon 20 μ g/ml :

Pour la pénicilline G étalon, nous avons obtenu, avec la longueur d'onde 325 nm, une courbe de bonne qualité avec un temps de rétention égale à $t_r = 2,46$ et une surface $S = 330$ (Figure 14).

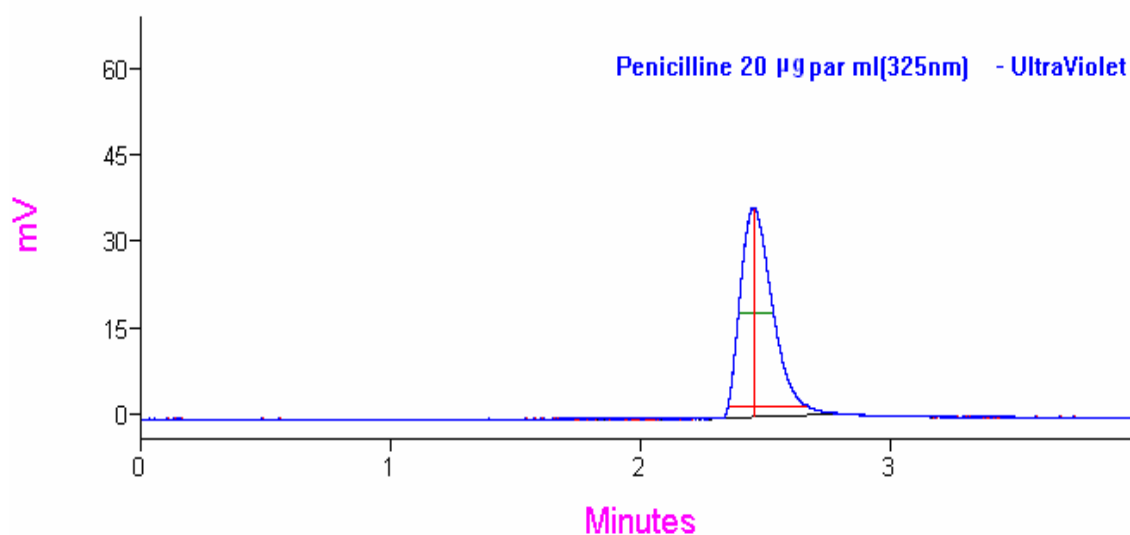


Figure 14: Pic de la pénicilline G étalon 20 μ g/ml

1.2.1.2. Les résultats des échantillons:

Pour les trente échantillons analysés, nous avons obtenu des pics, avec des temps de rétention très proches de celui de la solution étalon de pénicilline G et des surfaces très variables (voir annexe 3). La concentration moyenne des 30 échantillons est égale à 204,85 μ g/Kg (Tableau XVI).

Tableau XVI: Concentrations des échantillons en pénicilline G trouvées par HPLC

Echantillon	Surface	Concentration $\mu\text{g} / \text{kg}$
E ₁	503,77	122
E ₂	938,23	227,28
E ₃	829,83	201,02
E ₄	1275,02	308,90
E ₅	1117,99	270,82
E ₆	951,70	230,54
E ₇	947,56	229,54
E ₈	966,01	234,00
E ₉	947,82	229,60
E ₁₀	419,03	101,50
E ₁₁	627,67	152,05
E ₁₂	773,26	187,31
E ₁₃	663,45	160,71
E ₁₄	850,53	206,00
E ₁₅	936,50	226,86
E ₁₆	939,66	227,26
E ₁₇	1073,53	260,05
E ₁₈	963,47	233,39
E ₁₉	742,93	179,97
E ₂₀	924,46	223,94
E ₂₁	725,71	175,80
E ₂₂	889,52	215,48
E ₂₃	748,42	181,30
E ₂₄	867,61	210,17
E ₂₅	796,56	192,96
E ₂₆	732,49	177,44
E ₂₇	1015,94	246,10
E ₂₈	805,15	195,04
E ₂₉	584,44	141,57
E ₃₀	811,32	196,53
La moyenne des concentrations		204,85$\mu\text{g}/\text{kg}$
Ecart type		43,61

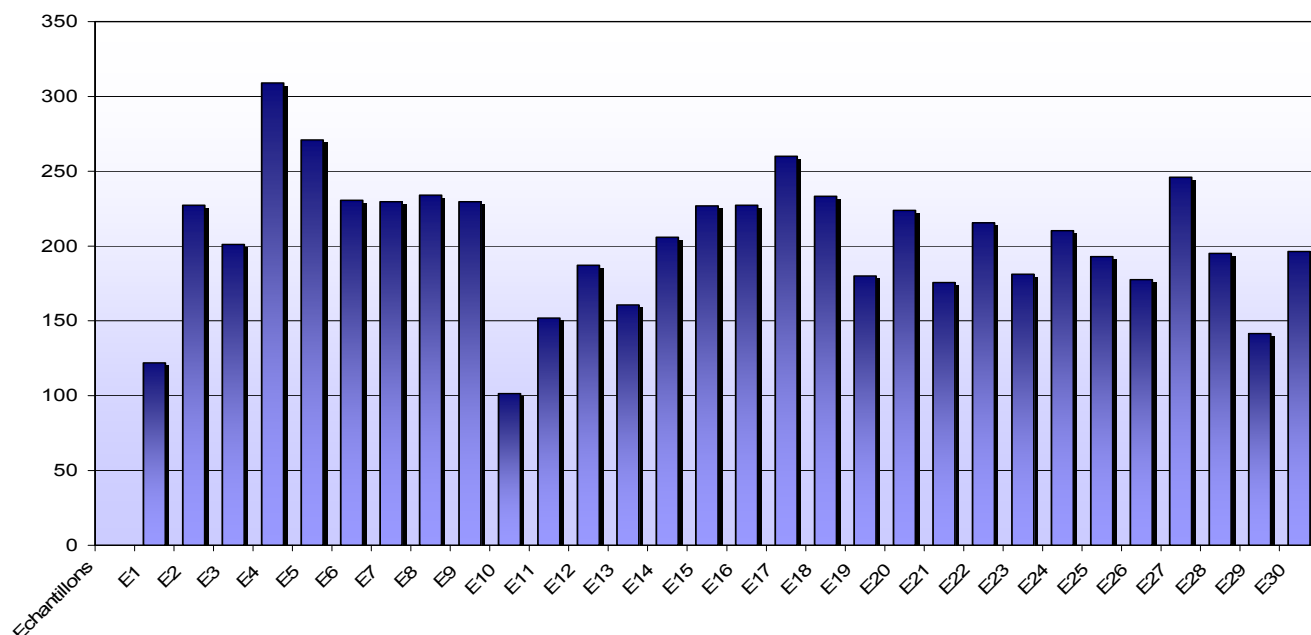


Figure 15: Histogramme des concentrations de pénicilline G détectées

1.2.2. Le résultat d'érythromycine étalon 20 μ g/ml :

Lors de l'injection de la solution étalon d'érythromycine à la longueur d'onde 287nm, nous avons remarqué, que son temps de rétention $t_r = 3,42$ était très proche de celui de la pénicilline G, donc un risque de chevauchement entre les pics des deux antibiotiques (pénicilline G et érythromycine) était possible lors de l'injection de l'éluât d'échantillons (Figure 16).

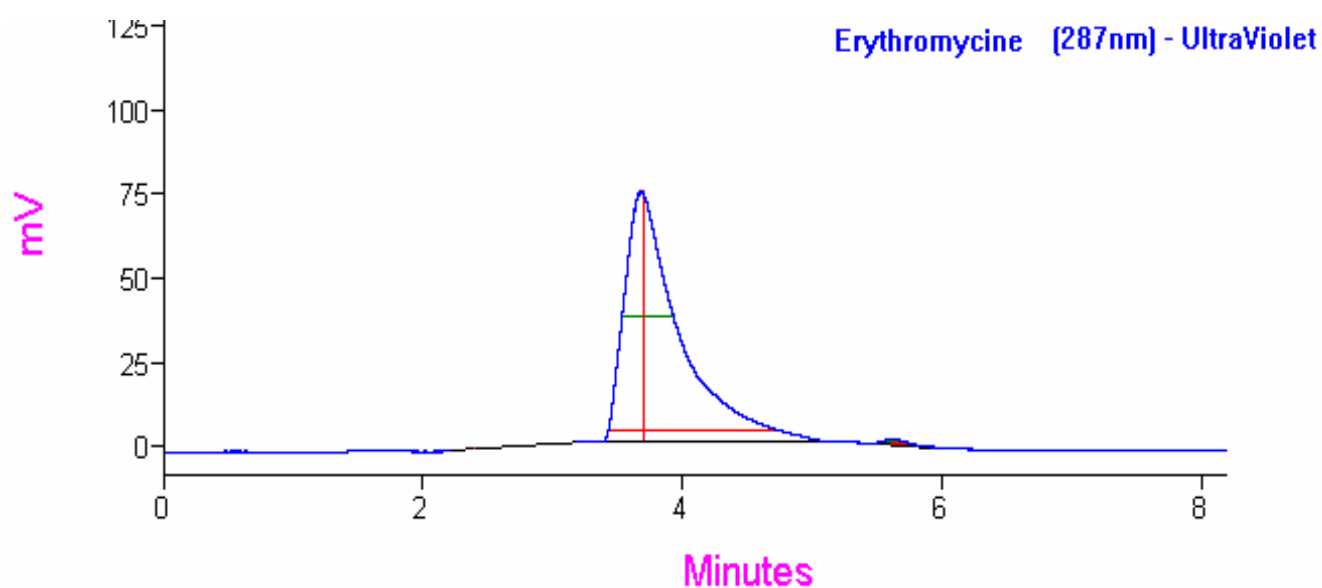


Figure 16: Pic de l'érythromycine étalon 20 μ g/ml

Pour éviter le chevauchement des deux pics, nous avons mélangé les deux solutions étalon d'antibiotiques et injecté 20 μ l de ce mélange dans HPLC.

Après une mise au point, et avec la longueur d'onde 287nm, nous avons obtenu une bonne séparation des deux pics. (Figure 17).

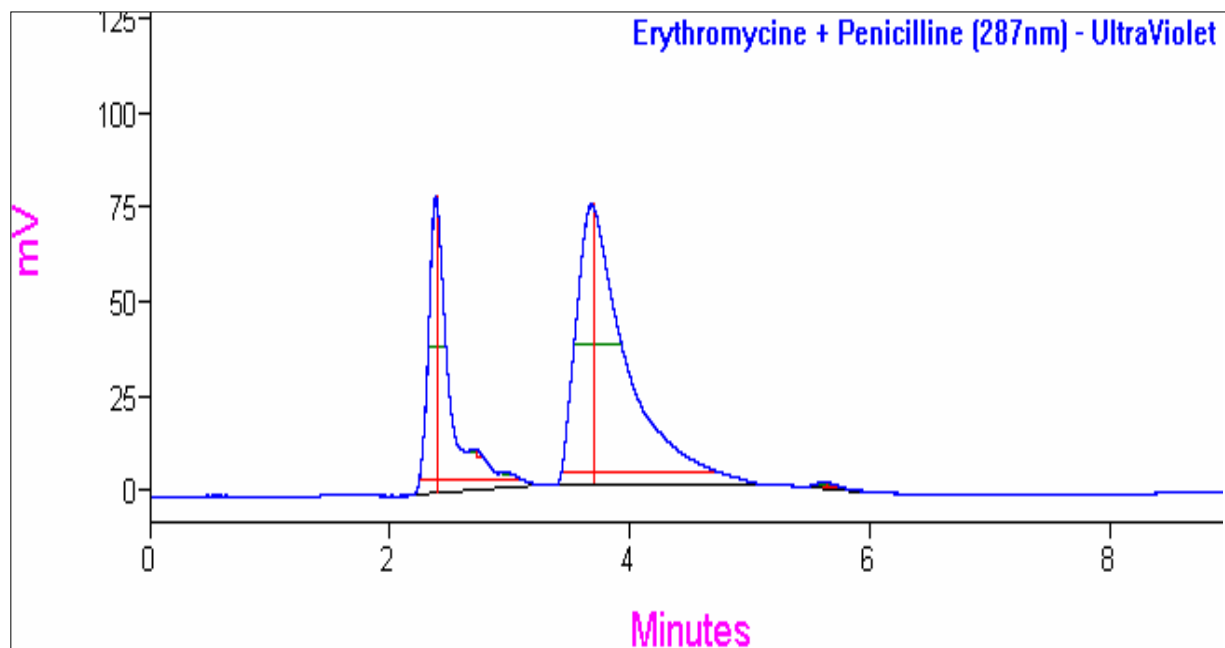


Figure 17: Pics des deux étalons associés (érythromycine et pénicilline G) à 20 μ g/ml

Pour des raisons techniques et économiques, nous avons quantifié les résidus d'érythromycine uniquement sur l'échantillon 15 (E₁₅) (Figure 18).

Nous remarquons que les pics de l'échantillon 15 sont semblables aux pics de la solution étalon contenant les deux antibiotiques. Le premier pic à la grande surface correspond à la pénicilline G et le second à l'érythromycine.

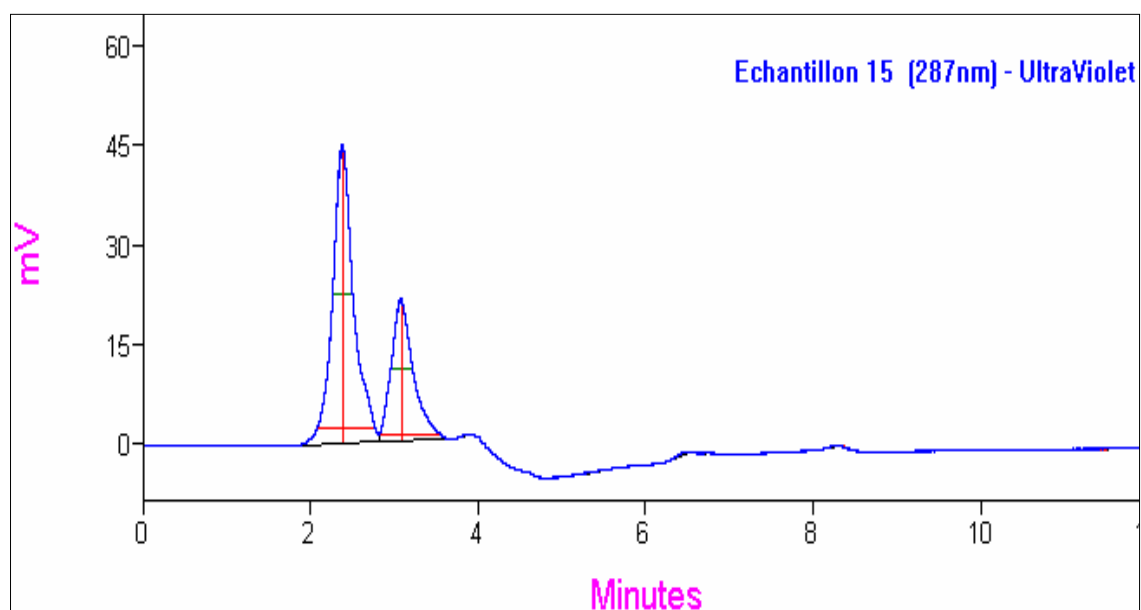


Figure 18: Les pics de pénicilline G et d'érythromycine détectés sur l'échantillon N°₁₅

Discussion

Chapitre IV: Discussion

Notre travail porte sur les objectifs suivants :

- détection de résidus d'antibiotiques dans le muscle du bréchet du poulet de chair
- mise au point d'une méthode pour quantifier les concentrations des résidus : chromatographie liquide haute performance
- comparer les concentrations des résidus détectés avec leurs limites maximales respectives, afin de voir l'état de salubrité des viandes.

Pour cela, nous avons appliqué deux méthodes pour rechercher les résidus sur trente (30) échantillons.

- La méthode microbiologique «Dite : méthode des quatre boîtes », méthode de référence dans les laboratoire belge et français (Fabre; 2003).
- La méthode chromatographique liquide haute performance plus sensible et permet la confirmation et la quantification des résidus détectées avec la première méthode.

Ces deux procédés nous ont permis de détecter deux familles d'antibiotiques (Béta lactamine et macrolide) des quatre recherchés.

La méthode microbiologique a permis de détecter les résidus de deux familles antibiotiques (Béta lactamine et macrolide) des quatre antibiotiques recherchés.

Les résidus Béta lactamine sont détectés sur deux (02) échantillons des trente (30) analysés, soit 6,66%. Les vingt huit (28) restants n'ont pas présenté de zones annulaires, ils sont alors considérés comme négatifs.

Les résidus de macrolide sont suspectés sur un seul échantillon des trente (30) analysés . Les vingt neuf (29) autres échantillons, sont considérés comme négatifs.

La méthode chromatographique a identifié l'antibiotique de la famille de beta lactamine « pénicilline G » qui a détecté cet antibiotique sur les trente échantillons analysés; soit un pourcentage 100% de positifs. Les concentrations des résidus détectés sur la totalité des échantillons étaient très élevées, dont la faible à de 204,85µg/kg dépasse largement la LMR (50µg/Kg dans le muscle), fixées par le Règlement CEE n° 2377/90 du Conseil du 4 mars 1999 (Maghuin et *al.*,2001).

Pour les macrolides « érythromycine », nous l'avons recherché avec HPLC uniquement sur l'échantillon suspect avec la première méthode. Les résidus d'érythromycine ont été identifiés, quantifiés et sa concentration était de $47,3\mu\text{g/Kg}$, elle reste inférieure à la LMR ($100\mu\text{g/Kg}$ dans le muscle), fixées par le règlement CEE n° 2377/90 du Conseil du 27 octobre 2000 (Maghuin et al., 2001).

La première remarque notable est la différence dans les résultats obtenus avec les deux méthodes, le pourcentage d'échantillons positifs obtenu avec la méthode HPLC est plus élevé que la méthode microbiologique. En effet la sensibilité de la méthode des 4 Boîtes est parfois insuffisante pour certains antibiotiques. De plus, cette phase de l'étude a présenté un taux élevé de faux négatifs (93,34%) et ceci démontre la limite de la méthode microbiologique qui reste non spécifique et utilisée comme test de dépistage dans des laboratoires (Maghuin et al., 2001).

La méthode chromatographique était plus sensible avec une capacité de détection élevée, soit 100% d'échantillons positifs pour les antibiotiques de la classe de bêta lactamines dont la plus faible concentration quantifiée dépasse largement la LMR.

Malgré son efficacité la chromatographie reste une technique lourde et très onéreuse, ce qui limite son usage à la confirmation des résultats obtenus avec méthodes simples et peu coûteuses.

Cette divergence dans les résultats peut être également expliquée par :

- la différence dans la taille de la prise d'essai des deux méthodes (méthode HPLC la prise d'essai = 5g) (méthode microbiologique = disque d'ordre μg)
- non homogénéité du poids des sujets étudiés.
- Les erreurs de manipulations sont aussi incriminées dans cette dissemblance dans les résultats.

Les concentrations élevées de résidus de pénicilline G trouvées dans le muscle, nous conduisent à penser que :

- les doses prescrites n'ont pas été observées, ou que
- le traitement à la pénicilline G est récent et que l'éleveur n'a pas respecté le délai d'attente
- le non respect de la fenêtre nécessaire à observer entre deux antibiothérapies (la pénicilline et l'érythromycine sont des antagonistes et leurs co-prescription est contre indiquée).

Des études sur les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale ont été déjà réalisées en Algérie, avec des méthodes d'analyses uniquement qualitatives.

En 2003, deux études similaires ont été effectuées dans la région de la Kabylie, portant sur la recherche des résidus d'antibiotiques dans le poulet de chair.

La première étude est effectuée par Khenniche sur 157 échantillons et a montré que 38,85 % étaient positifs aux antibiotiques (Khenniche et Riat. ;2003).

La seconde réalisée par Galleze, a révélé que 53 % étaient positifs sur les 177 échantillons de poulet de chair analysés issus des wilayas de Tizi-ouzou et Bejaia (Galleze et al. ;2003)

Une autre étude a été effectuée sur trois matrices (jabot, foie, rein) d'un même échantillon réalisée par l'équipe de Hadj Slimane, dans la région de Tlemcen et a détecté des résidus d'antibiotiques dans 78,5 % des échantillons analysés (200 échantillons).

Ces résultats concordant à notre résultat, confirment le mauvais usage des antimicrobiens dans nos élevages et démontrent que le problème d'innocuité des viandes blanches demeure posé.

En 2005 on a observé au Sénégal, des traces de furaltadone (famille des nitrofuranes) prohibée dans les élevages depuis 1994, à des teneurs variant de 0,7 à 243 µg/kg dans les poulets de chair (Abiola et al. ; 2005).

L'Office Fédérale de la santé publique de Berne a détecté fin 2002, des résidus de nitrofuranes dans la viande de volaille à des concentrations de 0,3 à 320 µg /kg, provenant des plus grands exportateurs de poulet de chair dans le monde (Brésil, Thaïlande, Chine. Depuis, une alerte communautaire renforçant la surveillance a été lancée de novembre 2002 à septembre 2003 et près de cinquante contrôles positifs aux antibiotiques ont été décelés dans des lots provenant du Brésil et de la Thaïlande. Cette situation prouve que les autorités sanitaires des pays concernés, informées de ces contrôles, n'ont pas réagi à cette présence d'antibiotiques constatée pendant plus de dix mois.

Dans la province orientale en Arabie Saoudite, des résidus de tétracyclines ont été trouvés dans 69,7% des poulets de chair *analysés* (Al-Ghamdi et al. ; 2001).

Une étude de la direction générale de l'alimentation française, réalisée en abattoir et en élevage au cours de l'année 1999 sur 1315 échantillons de volailles, a signalé 0,5% de cas positifs (Fosse, 2003).

Ces résultats démontrent que les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale ne sont pas un problème propre à notre pays, il concerne de nombreux pays. La cause majeure de ces résidus est les conditions d'élevages défaillantes qui prédisposent les animaux aux maladies infectieuses et à fin de remédier à ces carences l'éleveur utilise aléatoirement des anti-infectieux sans se soucier des conséquences et risques que peuvent engendrer cette habitude.

Conclusion :

Notre travail nous a permis d'établir un protocole d'analyse avec la chromatographie liquide haut performance, dans le but d'identifier et de quantifier les résidus d'antibiotiques dans la viande du poulet de chair.

Cette méthode a révélé la présence des résidus d'antibiotiques de la classe des bêta lactamine (pénicilline G) sur la totalité des échantillons analysés, avec des concentrations très élevées dont la plus faible dépasse largement la Limite maximal de résidus (pénicilline G) fixée par les normes internationales.

Contrairement à HPLC, la méthode microbiologique a donné beaucoup de faux négatifs elle a détecté des résidus d'antibiotiques uniquement sur deux (02) des trente (30) analysés. Ceci démontre la limite et la faible sensibilité de cette technique comparant à HPLC, cependant celle-ci demeure essentielle dans le dépistage, car elle est peu onéreuse et simple d'application.

Les concentrations élevées des résidus d'antibiotiques présentent dans le muscle, nous informe sur l'usage abusif des antibiotiques dans nos élevages, à afin permettre aux animaux de survivre aux mauvaises conditions de vie ainsi éviter les pertes économiques et de remédier aux contraintes engendrées par l'industrialisation de la filière avicole notamment les contraintes engendrées par le surpeuplement et les mauvaises conditions d'hygiène.

De ce fait, le contrôle de la présence des résidus dans les viandes et leur quantification s'avère indispensable et le développement de méthodes d'analyses plus fines et plus rapides devient donc primordial.

Perspectives :

Il est confirmé que la présence de résidus d'antimicrobiens dans les aliments d'origine animale pose des problèmes de santé publique. Il est impératif

- d'approfondir la recherche de résidus sur plusieurs localités et sur un nombre plus important d'élevage,
- rechercher les résidus sur plusieurs matrices,
- de développer une méthode de détection rapide et peu onéreuse afin que la recherche de résidus soit une analyse de routine dans nos laboratoires comme le sont les analyses microbiologiques,
- l'application du Décret exécutif n° 05-67 du 20 Dhou El Hidja 1425 du journal officiel algérien visant à rechercher de résidus d'antimicrobiens dans nos laboratoires.
- réglementer l'usage des antimicrobiens au niveau national,
- développer un système de suivi des ventes d'antibiotiques, en précisant les espèces concernées, afin d'avoir non seulement, une meilleure évaluation des quantités utilisées, mais également de disposer de données sur l'évolution des utilisations dans le temps. Ce suivi devrait être officialisé par une approche réglementaire, rendant obligatoires les déclarations de vente des médicaments,
- d'établir une politique de contrôle en matière de prescription et de distribution pour améliorer la maîtrise de l'utilisation des antibiotiques,
- d'imposer à l'éleveur un registre d'élevage pour permettre l'accès à toutes les données relatives à l'usage des antibiotiques pour l'ensemble des élevages d'animaux de production,
- organiser des formations à l'initiative des vétérinaires afin de sensibiliser l'éleveur qui est souvent peu conscient des conséquences d'une utilisation abusive et irraisonnée des antibiotiques.

- [1]- **Abiola. F, Diop. M, Teko-Agbo. A, Delepine . B, Biaou. F, Roudaut. B, Gaudin. V ; Sanders. P.** (2005). Résidus d'antibactériens dans le foie et le gésier de poulets de chair dans les régions de Dakar et de Thiès (Sénégal). *Revue Méd. Vét.*, 2005 ; 156, (5) ; 264-268
- [2]- **Agence Canadienne D'Inspection Des Aliments.** (2003). La résistance aux antimicrobiens.
www.inspection.gc.ca/francais/fssa/microchem/residu/residf.shtml
- [3]- **Agence Canadienne D'Inspection Des Aliments.** (2004). Résidus chimiques. 41p.
- [4]- **Agence Canadienne D'Inspection Des Aliments.** (2005). Échantillonnage et analyses.
www.inspection.gc.ca/francais/anima/meavia/meavif.shtml
- [5]- **Agence Canadienne D'Inspection Des Aliments.** (2005). Renseignements généraux sur les programmes et méthodes d'analyse.
<http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/>
- [6]- **Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments (Afssa).** (2004). Rapport sur la disponibilité du médicament vétérinaire en France, 37p.
- [7]- **Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments (Afssa).** (2006) Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. 214. pp 43-90, 113-129
- [8]- **Al-Ghamdi.M.S, Al-Mustafa.Z.H, El-Morsy.F, Al-Faky.A, Haider.I, Essa.H.** Résidus of tetracycline compounds in poultry products in the eastern province of Saudi Arabia. *public halth*, 2000, 114, 300-304.
- [9]- **Amghrous. S ; Kheffache. H.** (2007). L'aviculture algérienne en milieu rural, quel devenir après la libéralisation des échanges ? Cas des régions d'Aflou et de Freha » Conference of Agro-Food Social Scientists. 103rd EAAE Seminar '*Adding Value to the Agro-Food Supply Chain in the Future Euromediterranean Space*' Barcelona, Spain, 13P.
- [10]- **Beaumont. C, Le Bihan-Duval.E, Juin. h; Magdelaine.P.** 2004. Productivité et qualité du poulet de chair ; INRA ; Production Animale .
www.inra.fr/internet/productions- animales/an2004/num244/beaumon/cb244.htm
- [11]- **Benslimani, H. Ammari,D. Yala .**(2001) Action Des Antibiotiques In Vivo. *Médecine du Maghreb* n°91
- [12]- **Biologie et recherche,** (2003). Les différentes classes d'antibiotiques.
www.123bio_net/cours/antibio/index.html
- [13]- **Bories.G.** (1998). L'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale. *Rapport*. 37(7) ; p 4-5,10,14
- [14]- **Burnichon. N, Texier . A .** (2003) L'antibiogramme : La détermination des sensibilités aux antibiotiques. *DES en Bacteriologie* ;29P ; pp 3-8

- [15]- **Campus De Microbiologie Médicale.** (2005).
www.microbes-edu.org/index.html
- [16]- **Centre Belge D'information Pharmacothérapeutique (CBIPT).** (2004).
- [17]- **Centre De Coordination De La Lutte Contre Les Infections Nosocomiales (CCLCIN) De L'inter région Paris-Nord.** (2000). Antiseptiques et désinfectants. 87. p 7-18.
- [18]- **Chaslus-Dancla. E. ;** 2001. Les antibiotiques en élevage : Etat des lieux et problèmes poses ;INRA.Centre de Tour.
www.tours.inra.fr/urbase/internet/resultats/antibioresistance/antibio.htm
- [19]- **Chataigner. B, Stevens. A. ;** (2003). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar. THèse ;Ecole Nationale Vétérinaire ; Toulouse. 66 :p 6-8, 12-15,18.
- [20]- **Communiqué de Presse Berne,** (27.2.2002). Importations de poulet de Chine.
www.admin.ch/cp.f/index.html
- [21]- **Comite Du Codex Alimentarius.** (2005). Code d'usages visant à réduire au minimum et à maîtriser la résistance aux antimicrobiens. 16. p 2- 13.
- [22]- **Commission Des Communautés Européennes.** (2001). Stratégie communautaire de lutte contre la résistance antimicrobienne. Communiqué. Vol .1, Bruxelles. 22. p 10-12,16.
- [23]- **Corpet. D. E.** (2000).Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. Revue Méd. Vét, 2000. 151, p 2, 99-104
- [24]- **Dardenne.P, Vandeplas.S, Romnee.J.M, Boudry.C, Baeten.V, Berben.G, Renaville.R.** (2005) .Sécurité alimentaire et traçabilité. La contribution de plusieurs chercheurs de la Faculté des Sciences Agronomiques et du Centre Wallon de Recherches agronomiques.
- [25]- **Daube. G** (2005). Introduction à la microbiologie des aliments. Faculté de médecine vétérinaire microbiologie des denrées alimentaires.
http://fcserv.fmv.ulg.ac.be/mdaoa/mdaoa_home_fr.htm
- [26]- **Debrabander. H. Maghuin .R.** (1998) Analyse de la viande et des produits de viande. Faculté de médecine vétérinaire microbiologie des denrées alimentaires (Liège)
<http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/heasan/heasanf.shtml>.
- [27]- **Devie. P, Goaziou. L, Divol. A, Olivon. A, Gilbert. M, Petit.G, Laurent.S.** (2006). les antibiotiques dans l'alimentation animale. 30. p 3-8 ; 11-14
- [28]- **Direction Générale De L'alimentation,Sous Direction De La Santé et De La Protection Animale,Mission De Coordination Sanitaire Internationale, Sous Direction De La Réglementation ,De La Recherche et De La Coordination Des Contrôles.** Méthodes de dosage des sulfamides dans le muscle par chromatographie liquide haute performance. Note De Service : N 2004-8110, 06/04/2004 ;18P

- [29]- **Direction Générale De L'alimentation, Sous Direction De La Santé Et De La Protection Animale, Mission De Coordination Sanitaire Internationale, Sous Direction De La Réglementation ,De La Recherche Et De La Coordination Des Contrôles.** 2004. Méthode de confirmation des nitromidazoles dans le muscle et les œufs par CL/SM/SM (ESI) et méthode de confirmation des nitromidazoles dans les aliments pour animaux par CL/SM/SM (ESI). Note De Service. N 2004-8215, 17/08/2004; 26P
- [30]- **Direction Générale De L'alimentation, Sous Direction De La Santé Et De La Protection Animale, Mission De Coordination Sanitaire Internationale, Sous Direction De La Réglementation ,De La Recherche Et De La Coordination Des Contrôles.** Nouvelle méthode d'analyse pour rechercher des résidus d'antibiotiques dans les viandes avec Premi Test et une boîte utilisant un Bacillus cereus : mise en place d'une action pilote. N 2005-8217 ; DATE :08/09/2005 ; 4 p
- [31]- **Direction Générale De L'alimentation, Sous Direction De La Santé Et De La Protection Animale, Mission De Coordination Sanitaire Internationale, Sous Direction De La Réglementation ,De La Recherche Et De La Coordination Des Contrôles.** 2006. PLAN de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les viandes d'animaux de boucherie, de volailles, de gibiers, de lapins et de poisons d'élevage. N 2006-8240. 4.
- [32]- **Direction Générale De L'alimentation, Sous Direction De La Santé Et De La Protection Animale, Mission De Coordination Sanitaire Internationale, Sous Direction De La Réglementation ,De La Recherche Et De La Coordination Des Contrôles.** 2006. Dispositions générales relatives aux plans de surveillance et aux plans de contrôle de la contamination des denrées animales et d'origine animale et des produits destinés à l'alimentation animale pour l'année 2007. N 2006-8279. 72. pp 6-2.
- [33]- **Direction Des Médicaments Vétérinaires, Santé Canada.** (2002). les conséquences pour la résistance et la santé humaine. Rapport. 229 p.
www.geneve.ch/consommation
- [34]- **Direction Générale De La Santé Service De Protection De La Consommation De Genève.** (2003). Résidus de médicaments vétérinaires dans l'alimentation d'origine animale. Rapport Annuel. p 1-5.
- [35]- **Dolisi. G.** (2006). Manipulation microbiologique.
www.georges.dolisi.free.fr
- [36]- **Edder. P, Ortelli. D, Corvi. C.** Septembre (2003). Potentiel de la LC-ESI-MS/MS pour l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires. Communication. Service de protection de la consommation; Assemblée annuelle de Berne.
- [37]- **Edder. P.** (2002) Analyse des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale; Service de protection de la consommation Genève.
- [38]- **Edder. P, Ortelli .D.** (2004) Résidus de médicaments et denrées alimentaires. Service de protection de la consommation Genève.
www.geneve.ch/consommation.
- [39]- **Edder. P, Ortelli. D.** (2006). Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires."De l'étable à la table. Communication Journée scientifiques ccCTA

- [40]- **Encyclopédie médicale ; sulfamides** (2004)
www.vulgaris-medical.com/encyclopedia/sulfamide-4411.html
- [41]- **Euzeby, J.P.** 2005. Dictionnaire De Bactériologie Vétérinaire.
<http://www.bacdico.net>
- [42]- **Fabre. J.M.** . (2003). Des méthodes de recherche de résidus d'antibiotiques dans la viande. journal la semaine vétérinaire p25, 26
- [43]- **Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie (FMPMC).** (2006). Ressource en pharmacologie. Antimicrobiens. Chapitre 19.
- [44]- **FAO-** Procédure opérationnelle standard (pos) pour une analyse chimique Dosage des résidus de tétracyclines dans les tissus et le lait d'origine animale ; annexe 7.1.1
- [45]- **Fédération Nationale des Organisations Sanitaires Apicoles (FNOSA).** Mémento 2004. http://www.apiculture.com/fnosad/memento_2004.htm
- [46]- **Fenardji. F.** (1990). Organisation, performances et avenir de la production avicole en Algérie. Institut de développement des petits élevages, options méditerranéennes, l'aviculture en méditerranée Oued el Kerma, Birkhadem (Algérie). 19 (8). p 253-261
- [47]- **Ferrah. A.** (2005). Aide publique et développement de l'élevage en Algérie contribution a une analyse d'impact (2000-2005).10. p 5-8
- [48]- **Fosse.S ,Julien, Alban.** (2003). Les dangers pour l'homme liés à la consommation des viandes. Evaluation de l'utilisation de moyens de maîtrise en abattoir. Thèse de L'école National Vétérinaire de Nantes.285.
- [49]- **Foursa. L.** (2001). Habitudes et comportements du consommateur marocain a l'égard des produits carnés: cas de Casablanca. Thèse de hautes études du centre international de hautes études agronomiques méditerranéennes (CIHEAM). 103. p 4-24.
- [50]- **Galleze.G, Bouricha.L, Yahmi.M.** (2003). Contribution à la recherche de résidus d'antibiotiques dans le lait et dans la viande. Mémoire de fin d'étude, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, Faculté des Sciences Biologiques, Département des Sciences Agronomiques.
- [51]- **Girard. F, Moreda.R.** (2004). Travaux pratiques en microbiologie du lycée Docteur Lacroix – Narbonne. 3.
- [52]- **Gourmelen. C, Royer. E, Rugraff. Y.** (2002). Facteurs de croissance et produits alternatifs en alimentation porcine : Réglementation, modes d'action et conséquences technico-économiques. Rapport d'étude. Institut Technique du Porc, France, 97 p
- [53]- **Gourmelen C., Royer E., Salaün Y.** (2001). Impact d'une restriction de l'usage des facteurs de croissance antibiotiques sur le coût de production du porc. Journées de la Recherche Porcine en France. 33 : 291- 298
- [54]- **Hadj Slimane. A , Guerroud. K, Guerroudj.F.Z.** Recherche des résidus de substances antimicrobiennes dans quelques denrées alimentaires d'origine animale. Thèse de Université de Tlemcen Institut de biologie ;110.

- [55]- **ITAVI.** (2001). Le poulet standard. le mensuel de l'économie avicole. 9. p 2-9
- [56]- **ITAVI.** (2002). Développement et nutrition du poulet de chair. Note de synthèse. 10 p
- [57]- **Journal officiel Algérien.** Décret exécutif n° 05-67 du 20 Dhou El Hidja 1425
- [58]- **Journal officiel des Communautés européennes.** 28.11.2001.
- [59]- **Journal Officiel Du Grand – Duche De Luxembourg.** N° 41 Du 27 Mai 1982. 48.
- [60]- **kezzal.k** (1993). Les antibiotiques : Classification, résistance, action. Laboratoire de Microbiologie
- [61]- **Khenniche. R ; et Riat.S. ;** (2003). Contribution à la recherche de résidus d'antibiotiques dans la volaille type « poulet de chair » dans la wilaya de Tizi-ouzou et Boumerdes. Mémoire de fin d'étude, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou Faculté des Sciences Biologiques, Département des Sciences Agronomiques.
- [62]- **klopfentein. C.K.** (2004). Utilisation des antibiotiques en production porcine:ou sont les problèmes. Colloque sur la production porcine.14. pp 1-13.
- [63]- **Laboratoire De Fougères.** (2005). Recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. Rapport d'activités. 9.
- [64]- **Laure. M ; Muller. D.** (1995). Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes.Thèse de Doctorat Université Claude Bernard–Lyon. 143 ; pp17-19
- [65]- **Leclerc.B ; Gaillard.G. ;**(1995). Cours de microbiologie générale ; Lavoisier ; 3^{ème} édition ;Paris.
- [66]- **Les animaux malades de l'élevage -** Mensuel n° 405 - juin 2003.
<http://www.simv.org/Espace-Consommateurs/Actualites/2003/UFC-06.03.htm>
- [67]- **Ministere De L'Agriculture Et Du Développement Rural ;** (2003).
- [68]- **Maghuin. R, Janosi . A, Vaneeckhout. N, Vanpeteghem. C, Helbo. V, Sanders. E.** 2001. Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires. Rapport Final SSTC 1998-2001. 112P
- [69]- **Maghuin. R.** (2005). Evolution de la stratégie de contrôle. Articles de synthèse ann. med. vet., 2005, 149, pp183-187
- [70]- **Maghuin. R.** (2006). Résidus et contaminants des denrées alimentaires..Méthodes biologiques de dépistage. Ann. Méd. Vét.. 150. pp 125-130
- [71]- **Maghuin. R.** (2002). Hormones, substances anabolisantes et résidus de traitements vétérinaires en relation avec la sécurité alimentaire. faculté de médecine vétérinaire microbiologie des denrées alimentaires. In : Sécurité alimentaire du consommateur, 2ème édition. Coordonnateurs: M.Mollet N.Moll.Ed. TEC & DOC, Lavoisier. pp 65-91
- [72]- **Maghuin. R.** (2005). Résidus et contaminants des denrées alimentaires. Ann. Méd. Vét. 149. pp183-187.

- [73]- **Maghuin.R ; Amaya.J; Helbo.V; Vanpeteghem.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. Rapport Final SSTC 1998-2001. Législation UE.15.
- [74]- **Mitchell. M.** (2005) Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait de chèvre.
www.omafra.gov.on.ca/french/new/index.html
- [75]- **OFAL (OBSERVATOIRE DES FILIERES AVICOLES).** (2001). Filières et marchés des produits avicoles en Algérie année 2000. 117. pp 24-62
- [76]- **Office De L'Elevage France.** (2006). Marche des produits carnés et avicoles en 2005 France -Union Européenne-Monde ; 78P ;p 263-296
<http://www.sfm.asso.fr/>
- [77]- **OFIVAL.**(2003). La vente directe de viande bovine. Compte rendu n°2033215. 114. pp77-107
- [78]- **ONAB.** (2003). L'aliment destiné au poulet de chair durant les différentes phases d'âge
- [79]- **Pederson.KB , Edqvist.L; (2000).** Rapport sur l'emploi d'antimicrobiens comme activateurs de croissance : résistance au bon sens. Institut Français De L'environnement. pp 153-166
- [80]- **Perez .J.** (2005). Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas. Tesina Universidad De Belgrano Argentina. 44. pp 11-27
- [81]- **Popelka . P, Nagy. J, Germuska . R, Marcincak1 . S, Jevinova. P, De Rijk. A.** (2005). « Comparison of various assays used for détection of beta-lactam antibiotics in poultry meat ; 6p p 8-11.
- [82]- **Precis De Microbiologie Medicale** (2003)
<http://umr5558-mq1.univ-yon1.fr/moinwiki/sudD1/moin.cgi/Antibio>
- [83]- **Ressources animales.**2007. La plate forme de communication et de formation sur le développement durable en Afrique. Base documentaire sur l'élevage.
www.devenet.org
- [84]- **Schiro. J.** (2003). Réflexion sur les résidus d'antibiotiques.
www.beekeeping.org/spmf/sapmp/residusantibiotiques.htm
- [85]- **Scippo. L- ; Maghuin.R .** (2006). Méthodes biologiques de dépistage. Articles de synthèse. ann. med. vet., , 150, pp125-130
- [86]- **Service De Protection De La Consommation Genève .** (2003). Résidus de médicaments vétérinaires dans l'alimentation d'origine animale. Rapport; 8page ;pp1-8
- [87]- **Societe Francaise De Microbiologie.** (2006). L'antibiogramme. Communication. 50. p 2-49.

- [88]- **Toudji.N , Tassigaboumaza.N** (2004). Contribution à la recherche des résidus d'antimicrobiens dans les viandes rouges. Mémoire de fin d'étude, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou faculté des Sciences Biologiques , Département des Sciences Agronomiques. 77p
- [89]- **Union Luxembourgeoise Des Consommateurs-Euroguichet-Consommateur.** Contrôle des viandes. Protection des produits et des services. 43. pp 22-24
- [90]- **Université Catholique De Louvain.** (2002). Pharmacocinétique des antibiotiques
- [91]- **Universite De La Medecine Veterinaire De Montreal Canada** (2005)
www.medvet.umontreal.ca/etudes/EnseignementLigne/sciences_viandes/default.htm
- [92]- **Vanbelle.M, 2001.** Current status and future perspectives in E.U. for antibiotics, probiotics, enzymes and organic acids in animal nutrition. In : Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. (Edts). Gut environment of pigs. Nottingham University Press, Loughborough, UK : 231 - 256.
- [93]- **YALA. D, MERAD. A.S., MOHAMEDI. D, OUAR KORICH. M.N** (.2001). Classification et Mode d'Action Des Antibiotiques In Vivo. Médecine du Maghreb n°91.

Annexe (1) : Appareillages

Appareillages bactériologiques

- Bain-marie
- Deux étuves bactériologiques à (+30°) C et (+37°) C
- Autoclave
- Hotte
- Réfrigérateur
- Bec –bunsen
- pH mètre
- Agitateur plaque chauffante
- Matériel de manipulation :
 - Tubes à essai
 - Boîte de pétri
 - Pipettes pasteur
 - four Pasteur
 - Pincés
 - Flacons stériles 250 ml
 - Sacs pour les prélèvements d'échantillons
 - Micropipette 10 UL
 - Disques en papier de 7mm de diamètre stériles

Annexe (2) : Préparation des géloses

• Test agar à pH 6

- Peser 5g de test agar sous forme déshydraté dans la fiole.
- Additionner 200ml d'eau physiologique.
- Placer la fiole sur un agitateur plaque chauffante. Pour une bonne dissolution mettre un barreau aimanté dans la fiole.
- Verser cette gélose dans un flacon de 200 ml, et le mettre dans l'autoclave à 1 bar pendant 15 minutes.
- Laisser le flacon refroidir, et le placer dans l'étuve à (+45°C).

• Mueller Hinton à pH 7,2

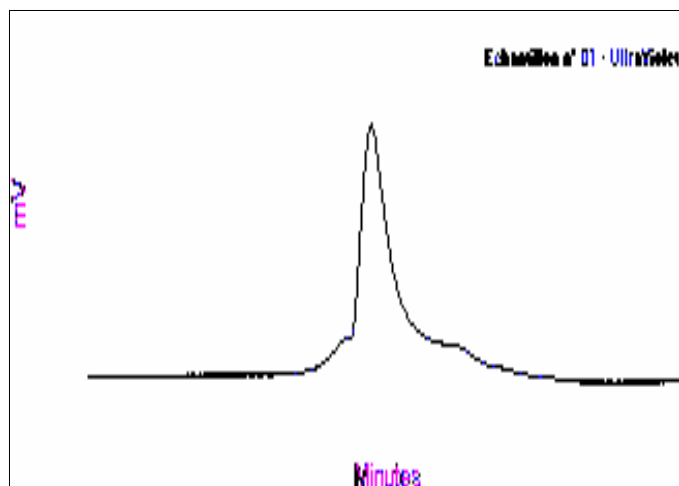
- Peser 7,2g de Mueller Hinton sous forme déshydraté dans la fiole.
- Additionner 200ml d'eau physiologique.
- Mettre la fiole sur un agitateur plaque chauffante. Placer un barreau aimanté dans la fiole pour avoir une bonne dissolution.
- Mettre cette gélose dans un flacon de 200ml, et le placer dans l'autoclave à 1 bar pendant 15 minutes.
- Laisser le flacon refroidir, et le placer dans l'étuve à (+ 45°C).

• Mueller Hinton à pH 8

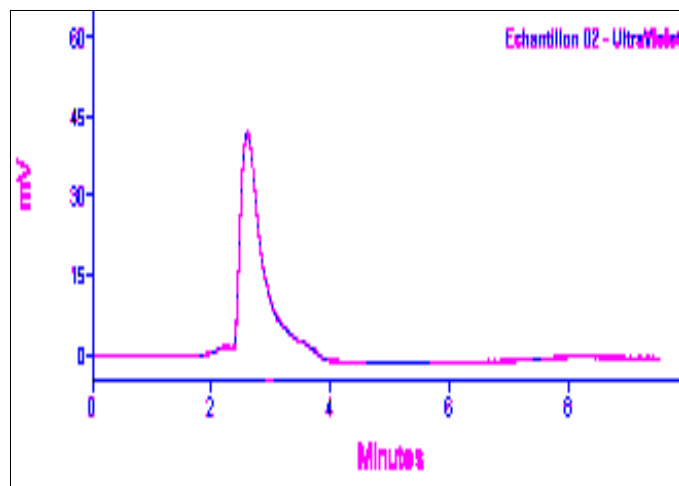
- Mettre 9,5 g de Mueller Hinton sous forme déshydraté dans la fiole.
- Additionner 250ml d'eau physiologique.
- Ajuster avec la potasse pour avoir le pH 8.
- Mettre la fiole sur un agitateur plaque chauffante, et pour une bonne dissolution, déposer un barreau aimanté dans la fiole.
- Mettre cette gélose dans deux flacons :
 - Un flacon de 100 ml pour *Micrococcus luteus*.
 - Un flacon de 150 ml pour *Bacillus subtilis*.
- Mettre les flacons dans l'autoclave à 1 bar pendant 15 minutes.
- Laisser les flacons refroidir, et les placer ensuite dans l'étuve à (+45°C).

Annexe 3 :

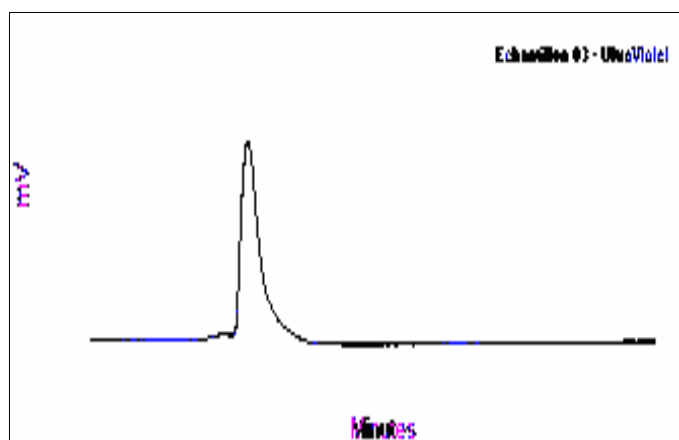
Les pics de pénicilline G trouvés dans les échantillons



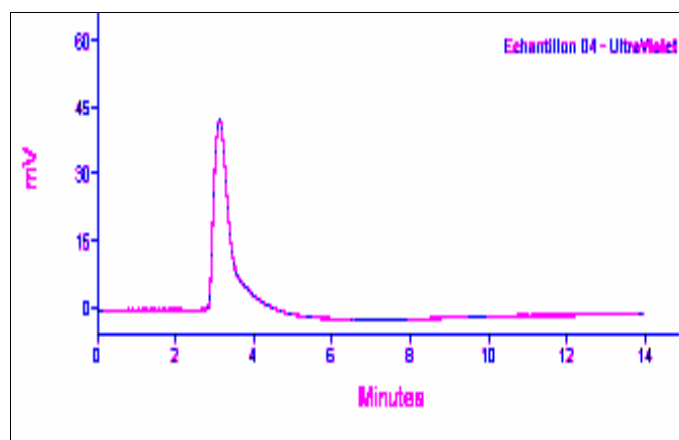
Tr = 2,77 surface = 503,77



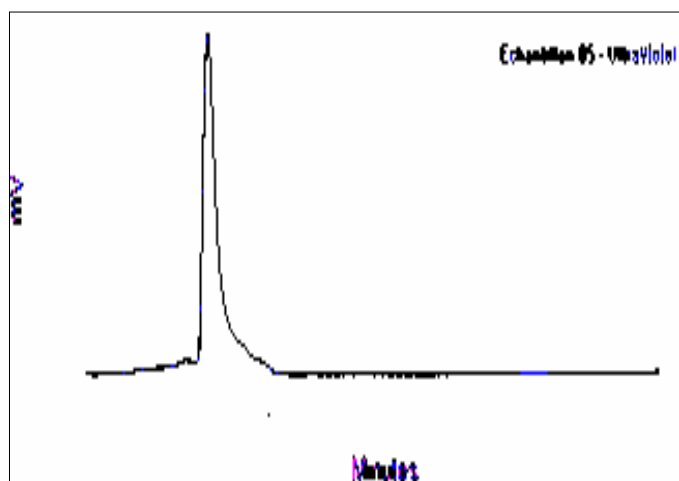
Tr = 2,59 surface = 938,23



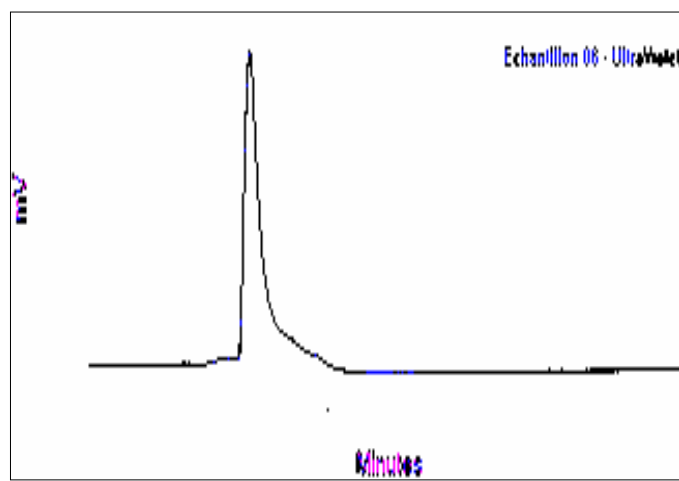
Tr = 2,8 surface = 1275,02



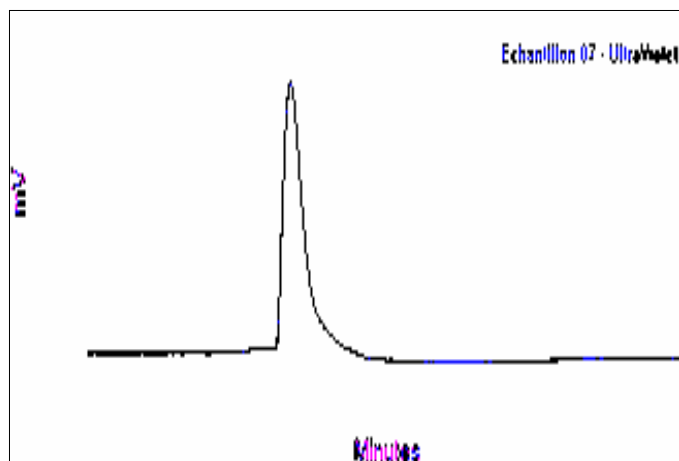
Tr = 2,72 surface = 829,83



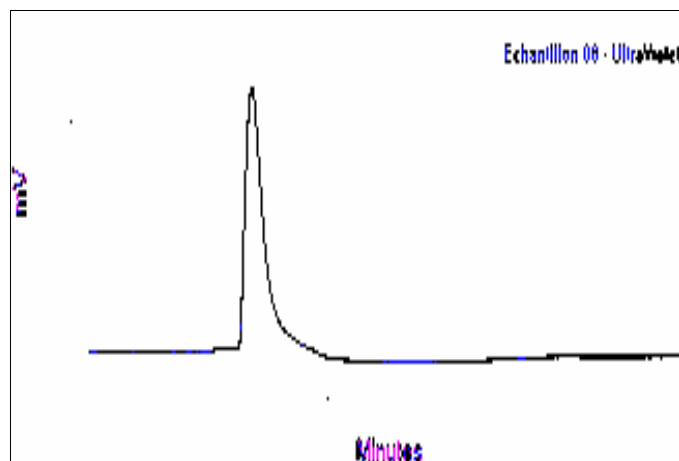
Tr = 2,72 surface = 1117,99



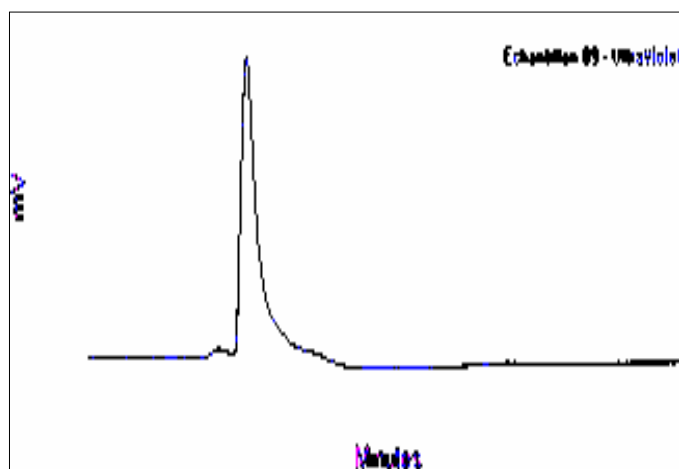
Tr = 2,68 surface = 951,7



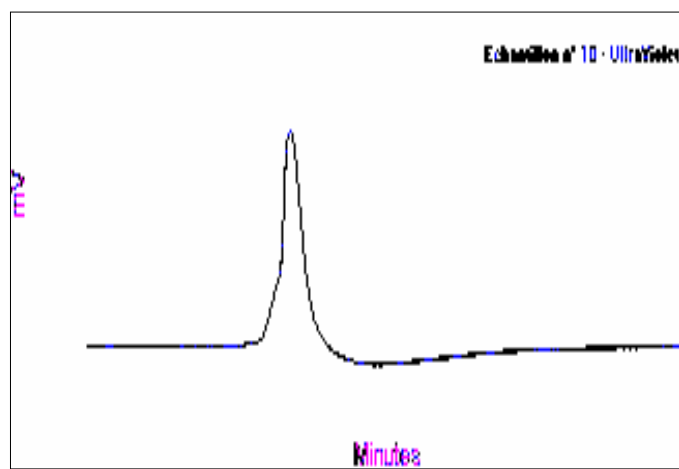
Tr = 2,72 surface = 966,01



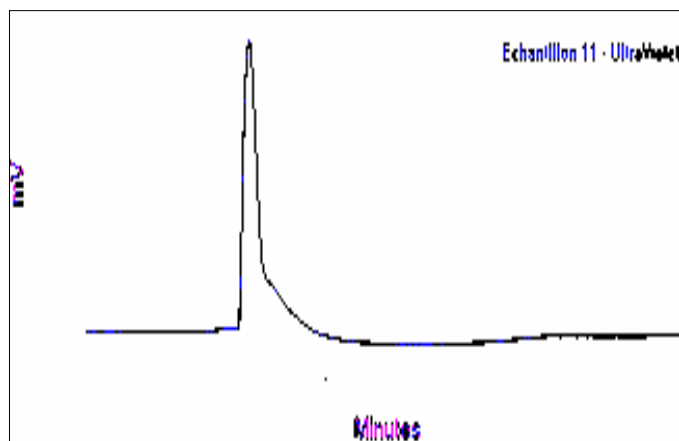
Tr = 2,72 surface = 966,01



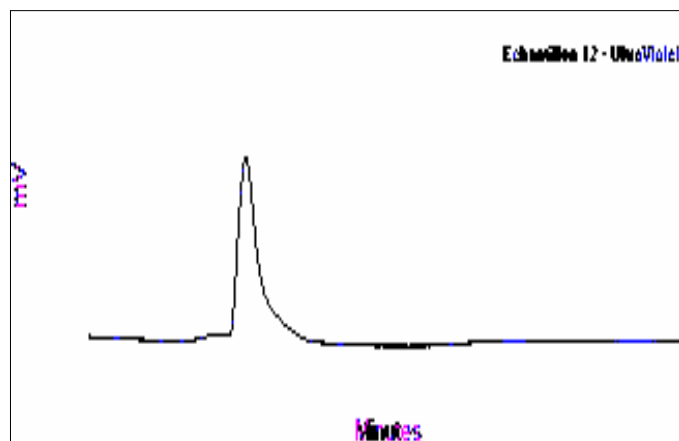
Tr = 2, 58 surface = 809,15



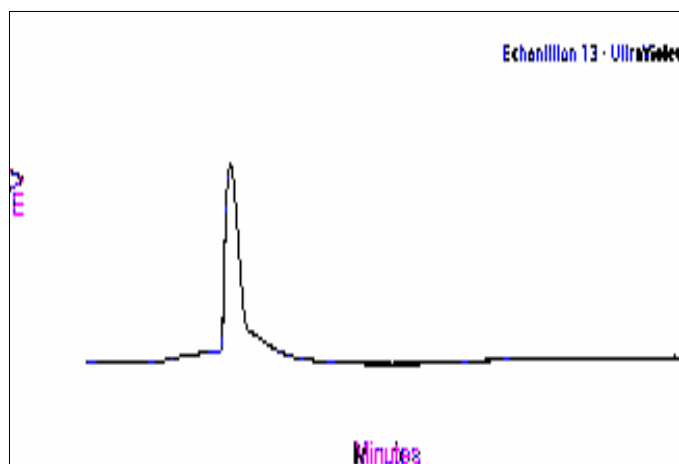
Tr = 2,65 surface = 947,82



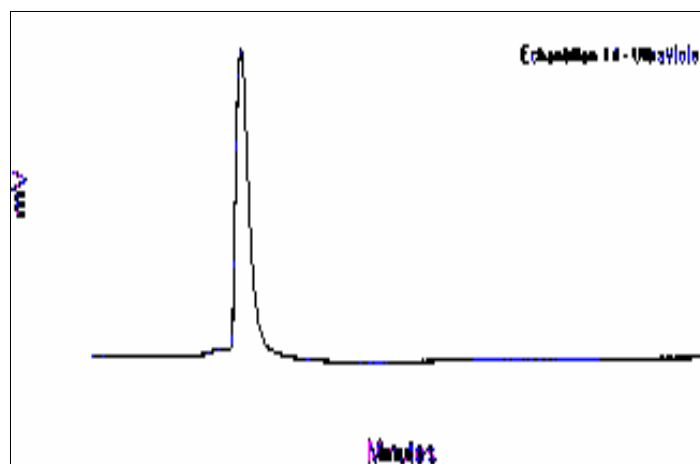
Tr = 2,54 surface = 419,03



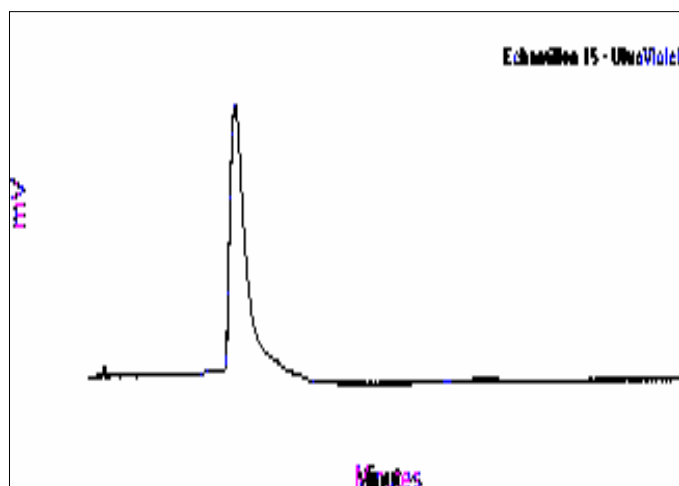
Tr = 2,71 surface = 627,67



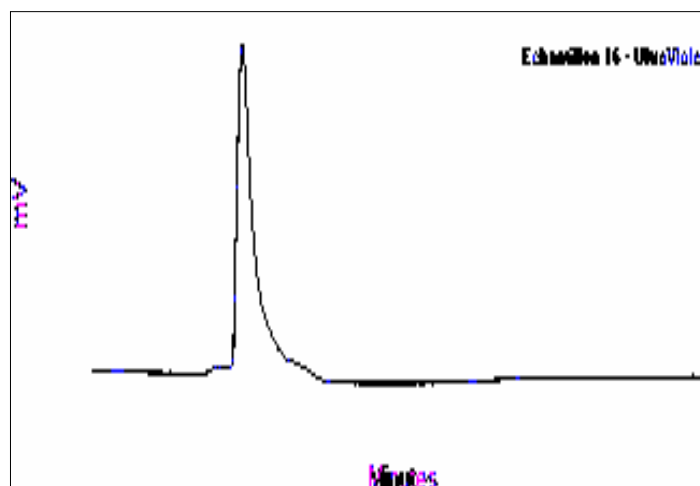
Tr = 2,64 surface = 773,26



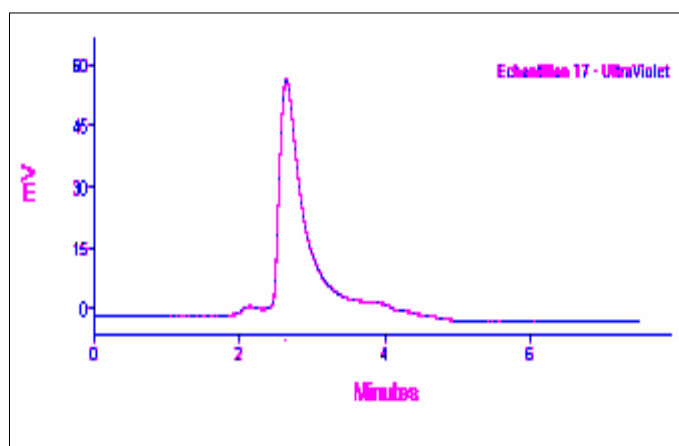
Tr = 2,46 surface = 663,45



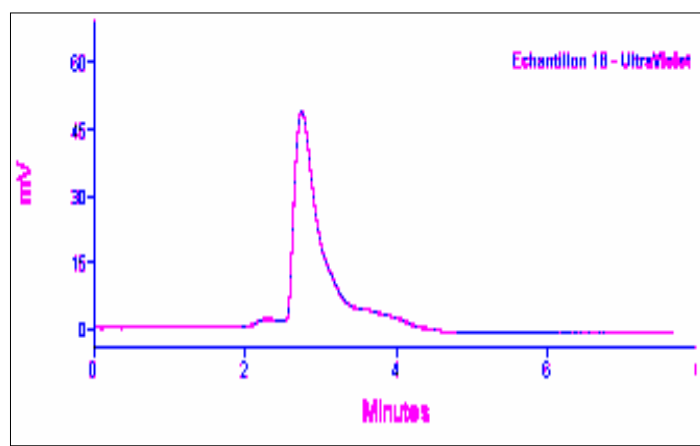
Tr = 2,95 surface = 936,5



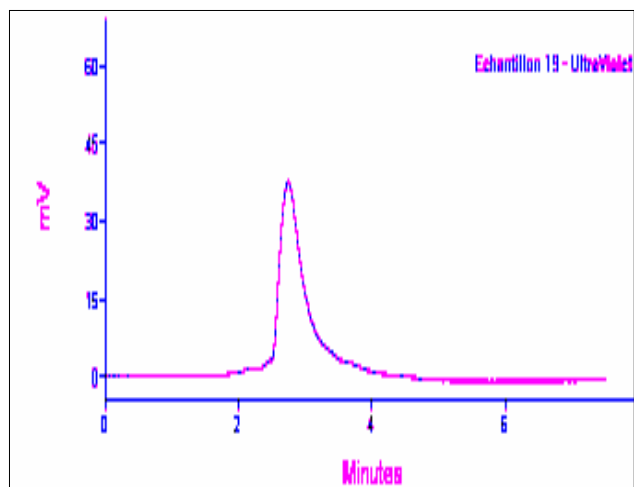
Tr = 2,42 surface = 850,53



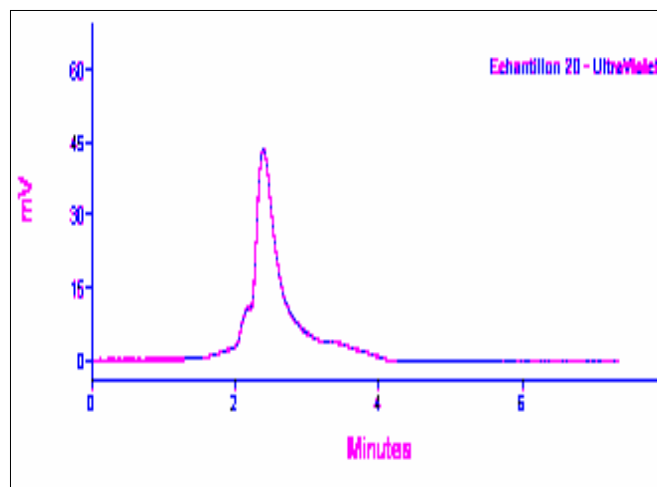
Tr = 2,43 surface = 939,66



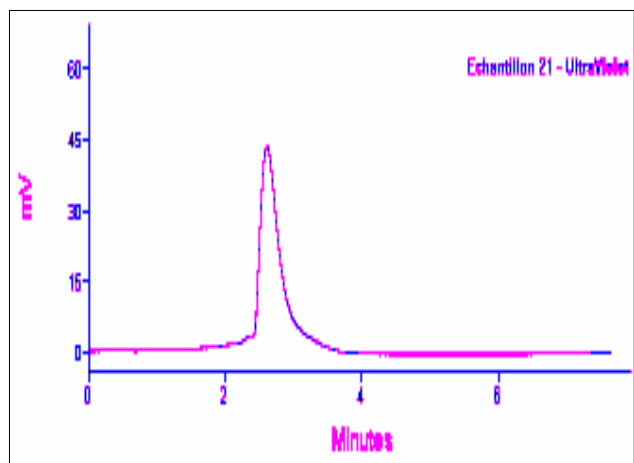
Tr = 2,65 surface = 1073,53



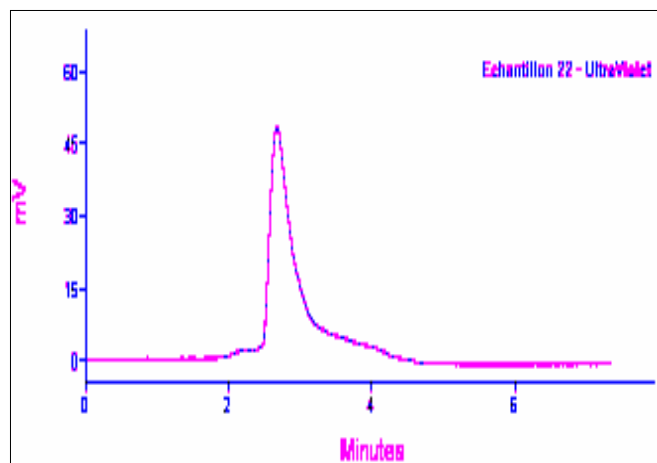
Tr = 2,72 surface = 963,47



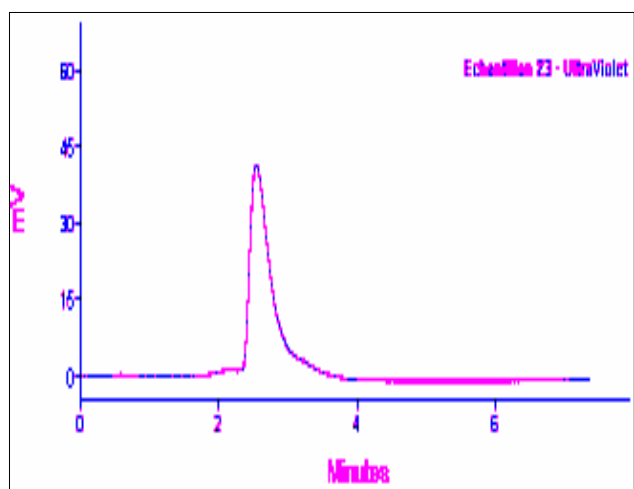
Tr = 2,76 surface = 742,93



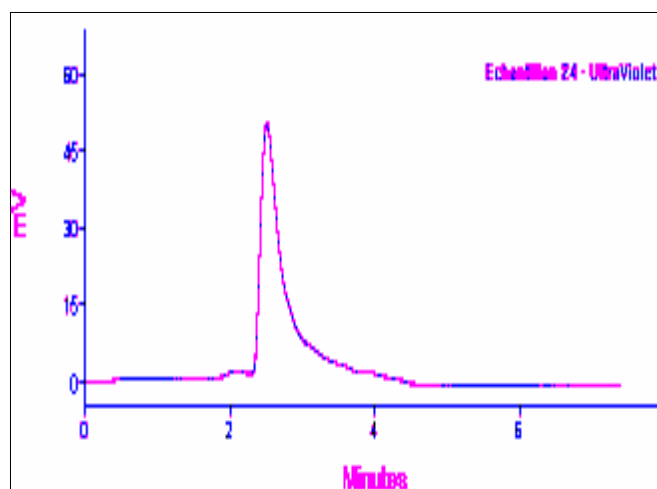
Tr = 2,58 surface = 924,46



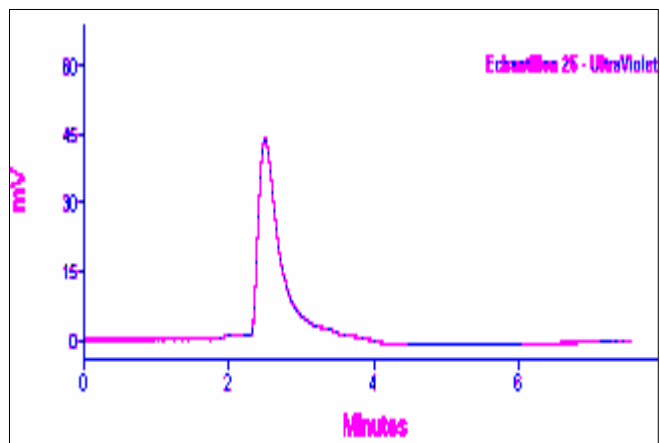
Tr = 2,63 surface = 725,71



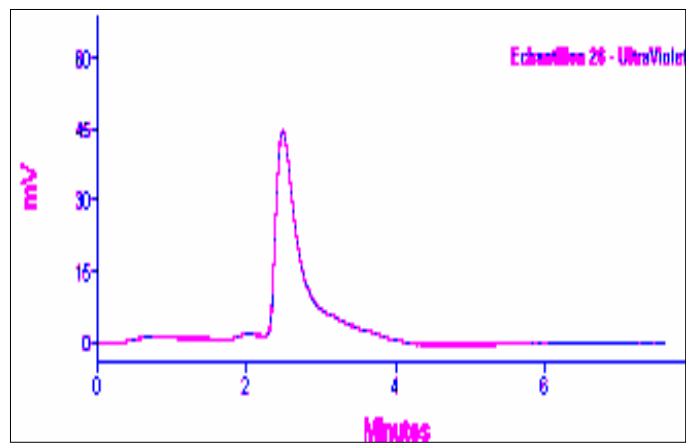
Tr = 2,6 surface = 889,52



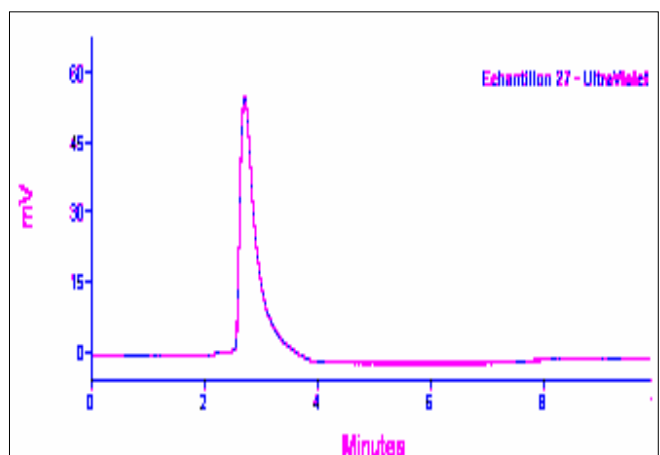
Tr = 2,54 surface = 748,42



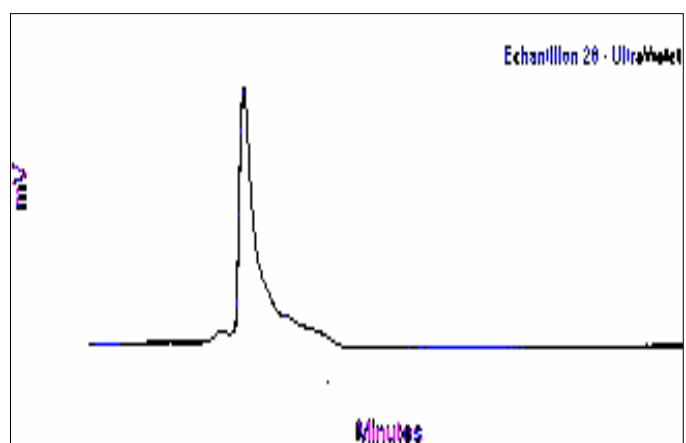
Tr = 2,51 surface = 867,61



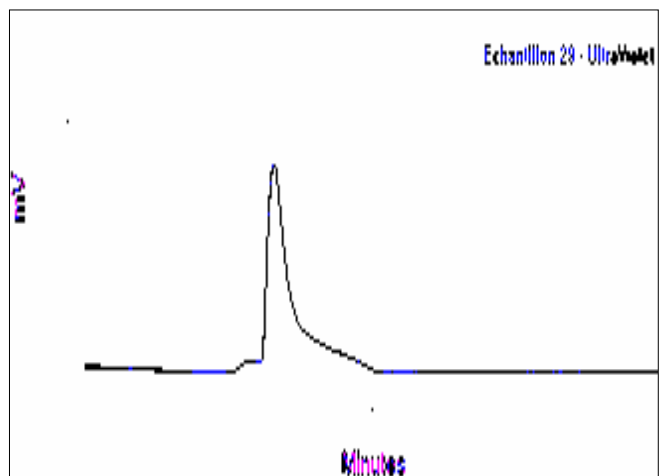
Tr = 2,52 surface = 732,49



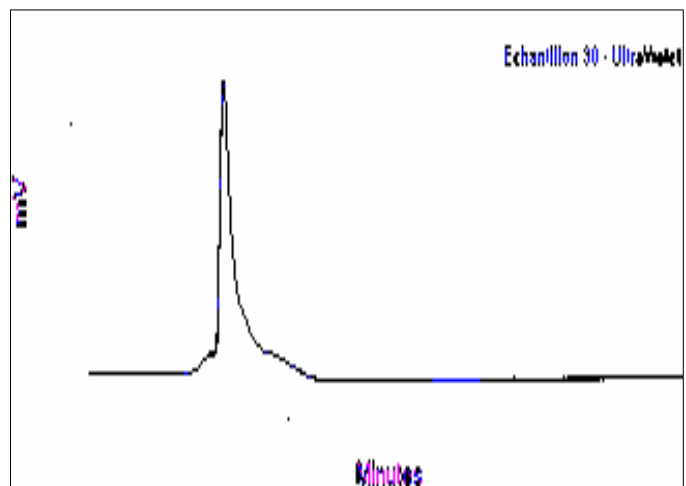
Tr = 2,72 surface = 1015,94



Tr = 2,58 surface = 809,15



Tr = 2,53 surface = 584,44



Tr = 2,7 surface = 811,32

Annexe (3)

**Figure 15: Résultats de pénicilline G des échantillons
analysés avec HPLC**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE -ALGER
المدرسة الوطنية للبيطرة – الجزائر

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister

Option

Hygiène et sécurité alimentaire

Thème

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RESIDUS D'ANTIMICROBIENS DANS LE MUSCLE DE POULET DE CHAIR

Présenté par :

Melle Chabha Ben Mohand

Soutenu le 13 Décembre 2007

Jury

Melle M. Ben Mahdi :	Maître de Conférence	Présidente
Mr A. Benouaddah :	Maître de Conférence	Promoteur
Mr B. Bendeddouche :	Maître de Conférence	Examineur
Mr M-T. Hamdi :	Chargé de Cours	Examineur
Mme S. Temim- kessaci :	Maître de Conférence	Examinatrice

Année universitaire : 2007/2008

Remerciements

Je dédie ce mémoire à mes chers parents adorés et à tout les membres de ma famille qui mon soutenu par leurs appuis durant mon travail.

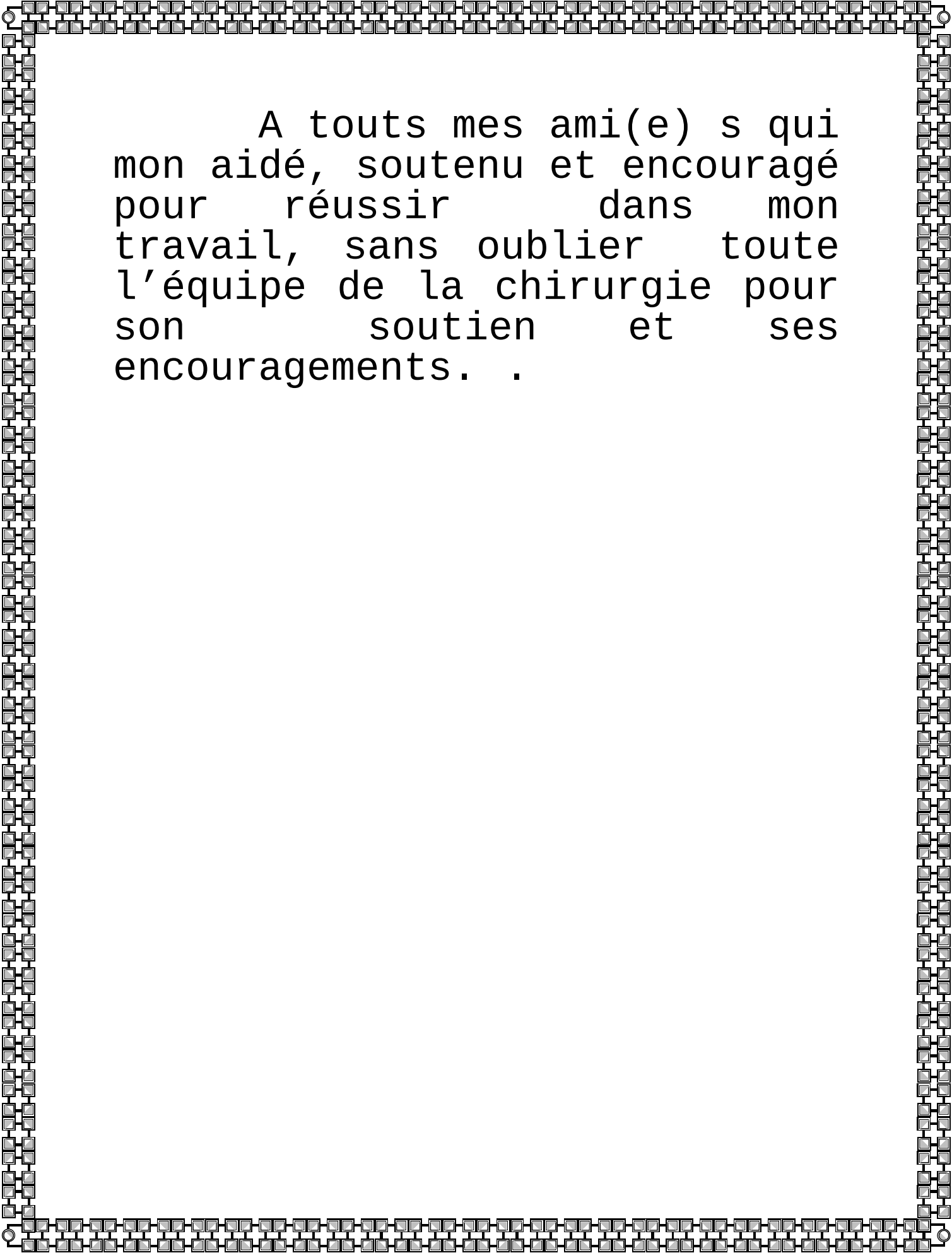
Je remercie Mr Ghozlane le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire, ainsi que tout le corps Enseignants qui m'ont donné la chance de réaliser ce mémoire.

Je tiens à remercier Mr Djbairia, le responsable du laboratoire Central de l'Intendance Militaire sis à El Harrach, ainsi que l'ensemble de l'effectif du laboratoire de microbiologie alimentaire et de toxicologie qui m'ont assistés et aider pour accomplir la partie expérimentale.

Touts mes respects et reconnaissance au promoteur Mr A. Benouaddah pour sa patience et ces conseils et la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces années.

Je remercie chaleureusement Melle M. Benmahdi. d'avoir accepté être la présidente de jury avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs Ben Deddouche.B et Hamdi.M.S et Mme Témmim.S qui ont accepté de juger ce mémoire avec beaucoup d'attention et qui ont accepté d'en être les examinateurs.



A tous mes ami(e) s qui
mon aidé, soutenu et encouragé
pour réussir dans mon
travail, sans oublier toute
l'équipe de la chirurgie pour
son soutien et ses
encouragements. .

RESUME

Notre travail porte sur l'étude des résidus d'antibiotiques dans le poulet de chair, produit qui connaît une large consommation vu sa disponibilité et son prix raisonnable pour toutes les catégories sociales.

Notre recherche est menée sur le muscle du bréchet d'une trentaine d'échantillon dans le but de détecter les résidus appartenant à deux groupes de produits utilisés en thérapeutique vétérinaire:

- les antibiotiques
- les sulfamides

Pour cet effet, nous avons appliqué deux méthodes :

- Méthode microbiologique: Elle permet la mise en évidence des antibiotiques (pénicillines, macrolides, aminosides) et des sulfamides à l'aide de micro-organismes sensibles (dans notre étude : *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*), mais sans déterminer leur identité. Deux familles d'antibiotiques sont détectés avec cette technique : bêta lactame (pénicilline G) et macrolides (érythromycine) sur deux échantillons des trente analysés.
- Chromatographie liquide haute performance (HPLC): C'est une méthode plus sensible, permet l'identification et la quantification des résidus d'antibiotiques, et la confirmation des résultats obtenus avec la méthode microbiologique.

Après une permise une mise au point d'un protocole d'analyse avec HPLC, la totalité des échantillons étudiés été positifs à la pénicilline G avec des concentrations supérieures à 50µg/kg de muscle, limite maximale de résidus de cet antibiotique tolérée et fixée par le Règlement CEE n° 2377/90 du conseil du 04 mars 1999 (Maghuin et al. ,2001).

Cependant, l'érythromycine a été recherchée sur un seul échantillon pour des raisons de contraintes techniques et dans le but de confirmer le résultat de la méthode microbiologique et sa concentration été dans les normes.

Mots clés: Viande de volaille, résidus, antibiotiques, détection

Abstract

Our work concerns the study of the antibiotic residues in the product, table fowl which knows a raised request considering its availability and its reasonable price for all the social categories.

Our search for antibiotic residues in the muscle is undertaken on a sample of a private breeding located in the area of Bouira. To identify the antibiotic residues, we practised the microbiological method frequently used in the laboratories, but to quantify them, we developed a new method: liquid chromatography high pressure. These two processes highlighted the residues of two families of antibiotics: Penicillin G, and erythromycin. The first allowed to identify residues penicillin G in two samples, whereas the second identified and quantified in the totality of the analyzed samples. In those, the revealed concentrations largely exceed the maximum limit of residues authorized. This second method with also made it possible to quantify the concentration of the erythromycin in the positive sample analyzed with the microbiological method.

Sommaire

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviation

Introduction

Partie Bibliographie

Chapitre I : Production avicole dans le monde et rappels sur l'élevage du poulet de chair

Partie I : Production avicole.....	1
1. Production avicole dans le monde	1
2. Production avicole en Algérie	2
Partie II : Rappels sur l'élevage de poulet de chair	4
1. Normes techniques.....	4
1.1 . Alimentation	4
1.2 . Traitements sanitaires	5
2. Réglementation	6
2.1 . Réglementation Européenne	6
2.2 . Réglementation Algérienne	9

Chapitre II : Les substances antimicrobiennes

1. Définition des antimicrobiens	11
2. Nature des substances antimicrobiennes	11
2.1 . Antibiotiques	11
2.1.1. Définition des antibiotiques	11
2.1.2. Classification des antibiotiques.....	11
2.1.3. Usage des antimicrobiens en élevage avicole	13
2.1.3.1. Usage thérapeutique	13
2.1.3.2. Usage zootechnique	13

2.1.4. Principaux antibiotiques utilisés dans les élevages avicoles	14
a. Les Beta-Lactamines	14
b. Les Aminosides ou Aminoglycosides	14
c. Les Macrolides	14
d. Les Tétracyclines	15
2.1.5. Mode d'action des antibiotiques	15
a. Action sur la paroi.....	16
b. Action sur la membrane des cellules	16
c. Action sur l'ADN	16
d. Action sur les protéines	16
2.1.6. Pharmacocinétique des antibiotiques	17
a. Absorption	17
b. Diffusion tissulaire	17
c. Biotransformation	18
d. Elimination	18
2.1.7. Evaluation de l'activité des antibiotiques	20
a. Antibiogramme	20
b. Concentration minimale d'inhibition CMI	21
c. Concentration minimale bactéricide CMB	21
2.1.8. Association des antibiotiques	21
2.2 . Les Sulfamides	22
2.2.1. Définition des sulfamides	22
2.2.2. Mode d'action et métabolisme des sulfamides	22
3. Risques présentés par l'usage des antimicrobiens	23
3.1 . Présence des résidus	23
3.1.1. Définition de résidus	23
3.1.2. Causes de la présence des résidus dans la viande	24
3.1.3. Préoccupations.....	24
3.2 . L'acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries.....	25
3.2.1. Résistance naturelle.....	25
3.2.2. Résistance acquise.....	25

3.3 . Modalités de résistance des bactéries	25
3.3.1. Mécanismes biochimiques de résistance	26
a. Le brouillage.....	26
b. Le camouflage.....	26
c. Le blindage	26
d. L'esquive	26
3.3.2. Mécanismes génétiques de résistance	27
a. Transduction	28
b. Transformation	28
c. Conjugaison	28

Chapitre III: Méthodes de dépistage des résidus

1. Méthode microbiologique	29
1.1 . Diffusion sur gélose	29
1.2 . Technique en milieu liquide	30
2. Méthode immunologique	30
2.1 . Radio Immuno Assay (Tests RIA)	30
2.2 . Radio Récepteur Assay (RRA)	30
2.3 . Test ELISA	30
2.4 . Le test Penzym	31
2.5 . Test β -STAR	32
3. Méthode physico-chimique.....	32
3.1 . Chromatographie en phase liquide à haute pression	32

Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériels	33
1. Matériels de la méthode microbiologique	33
1.1 . Matériels biologiques	33
1.1.1. Viande blanche	33
1.1.1.1. Origine des échantillons	33
1.1.1.2. Prélèvement des échantillons	34
1.1.2. Micro-organismes utilisés	34
1.2 . Produits chimiques et réactifs	35
1.2.1. Milieux de culture	35
1.2.2. Réactifs	35
1.2.3. Antibiotiques	35
1.3 . Appareillages	35
2. Matériels de la méthode chromatographique	36
2.1 . Appareillages	36
2.2 . Réactifs	36

Chapitre II : Méthodes	
1. Méthode microbiologique	37
1.1 . But	37
1.2 . Principe	37
1.3 . Application	37
1.3.1. Remise en activité des micro-organismes test.	37
1.3.2. Préparation de l'inoculum	38
1.3.2.1. Dilutions des solutions mères	38
1.3.2.2. Ensemencement des dilutions sur gélose Triptocaseine soja	39
1.3.2.3. Dénombrement	39
1.3.3. Recherche de résidus d'antibiotiques dans le muscle	40
1.3.3.1. Préparation des géloses	40
1.3.3.2. Préparation des solutions d'antibiotiques témoins	40
1.3.3.2.1. Préparation de la solution Triméthoprime	40
1.3.3.2.2. Préparation de la solution Dihydrostreptomycine	40

1.3.3.3. Préparation des boîtes de Pétri	41
1.3.3.4. Traitement des échantillons	42
2. Méthode chromatographique	43
2.1 . Préparation des solutions	43
2.1.1. Préparation des solutions pour traiter les échantillons	43
2.1.2. Préparation des solutions étalons d'antibiotiques	44
2.1.2.1. Préparation de la solution mère de Pénicilline G 100µg/ml	44
2.1.2.2. Préparation de la solution mère d'érythromycine 100g/ml.....	44
2.2 . Préparation des échantillons	45
2.2.1. Extraction	45
2.2.2. Déprotéinisation	45
2.2.3. Purification	45
2.3 . Injection de l'éluât dans HPLC	46
2.4 . Quantification des concentrations de résidus	47
2.4.1. Quantification de pénicilline G présente dans les échantillons	47
2.4.2. Quantification d'érythromycine présente dans les échantillons	48

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie I : Résultats.....	49
1. Résultats de la méthode microbiologique	49
2. Résultats de la méthode chromatographique	52
2.1 . Résultat de la pénicilline G	52
2.1.1. Résultat de la pénicilline G étalon 20µg/ml	52
2.1.2. Résultat des échantillons	52
2.2 . Résultat d'érythromycine étalon 20µg/ml	54

Partie II : Discussion

Conclusion

Perspectives

Bibliographie

Annexe

Liste des tableaux

Tableau I: Les principaux pays producteurs de poulet de chair-----	1
Tableau II: Structure de la production avicole en Algérie (OFAL, 2000) -----	2
Tableau III: Evaluation de la disponibilité de la viande blanche en Algérie-----	3
Tableau IV: L'aliment destiné au poulet de chair durant les différentes phases d'âge-----	4
Tableau V: les traitements médicaux effectuées aux poulets de chair-----	6
Tableau VI: Textes officiels et interdictions concernant plusieurs additifs en alimentation animale. -	8
Tableau VII: Les antibiotiques homologués en Algérie comme facteur de croissance-----	9
Tableau VIII: Les antibiotiques homologués en Algérie à usage thérapeutique-----	10
Tableau IX: les principales classes d'antibiotiques spectre et mode d'action-----	12
Tableau X: Paramètres pharmacocinétiques de quelques antibiotiques-----	19
Tableau XI: Familles d'antibiotiques tests en fonction des souches et du pH du milieu-----	34
Tableau XII: Les diamètres d'inhibition des antibiotiques témoins-----	49
Tableau XIII: Nombre d'échantillons positifs aux antibiotiques tests-----	50
Tableau XIV: Diamètre des zones annulaires des échantillons positifs-----	51
Tableau XV: Résultats de la méthode microbiologique-----	51
Tableau XVI: Concentrations des échantillons en pénicilline G trouvées par HPLC-----	53

Liste des figures

Figure 1: Mode d'action des différentes familles d'antibiotiques -----	15
Figure 2: Les zones translucides d'un antibiogramme -----	20
Figure 3: La lecture d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé ---	20
Figure 4: Mode d'action des sulfamides -----	23
Figure 5: Modalité de résistance chez la bactérie-----	27
Figure 6: Réseau de transfert de résistance à l'homme-----	28
Figure 7: Principe du Radio Immuno Assay et du Radio Récepteur Assay -----	31
Figure 8: Principe Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) -----	31
Figure 9: Principe du B-STAR 100 -----	32
Figure 10: Les étapes de l'activation des souches-----	38
Figure 11: Les dilutions de la solution mère de BS pour la recherche de l'inoculum-----	39
Figure 12: Disposition des échantillons sur la boîte de Pétri -----	42
Figure 13: Résultats de la méthode microbiologique-----	50
Figure 14: Pic de la pénicilline G étalon 20µg/ml-----	52
Figure 15: Histogramme des concentrations des échantillons en pénicilline G -----	54
Figure 16: Pic de l'érythromycine étalon 20µg/ml-----	54
Figure 17: Pics de l'érythromycine et de la pénicilline G à 20µg/ml-----	55
Figure 18: Les pics de l'échantillon numéro 15-----	56

La liste des abréviations

ACIA :	Agence canadienne d'inspection des aliments
AFNOR :	Association française de normalisation
Afssa :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
BHT :	Buthyl Hydroxy Toluène
CAC :	Comité du Codex Alimentarius
CBIPT :	Centre Belge D'information Pharmacothérapeutique
CCLIN:	Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
HPLC :	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Pression
CIV :	Centre d'Information des Viandes
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CNC :	Chambre Nationale de Commerce
CNRC:	Centre Nationale des Registres de Commerce
D.M.V :	Direction des Médicaments Vétérinaires
DSV :	Direction des Services Vétérinaires
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FMPMC:	Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie
ITAVI :	Institut Technique Avicole
J.O :	Journal Officiel
LMR :	Limite Maximale de Résidus
MADR:	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
OFAL :	Observatoire de La Filière Avicole
OFIVAL:	Office International des Viandes et de l'Aviculture
ONAB :	Office Nationale des Aliments de Bétail
RIA:	Radio Immuno Assay
RRA :	Radio Récepteur Assay
SIMV :	Syndicat National des Médicaments Vétérinaires et réactifs
U.E :	Union Européenne
UCL :	Université Catholique De Louvain

Introduction :

Avec les grands investissements consentis par les secteurs privés et publics, Portées par l'engouement du consommateur algérien pour les produits d'origine avicole, la production avicole en Algérie connaît un développement considérable.

Cependant, l'intensification du développement de la filière avicole n'évolue pas sans problèmes, ce qui risque de porter atteintes à la rentabilité et à la qualité des produits.

Afin de remédier à ces contraintes, la médication et la prophylaxies sont recommander pour d'amortir les pertes économiques. L'antibiothérapie arrive en première position.

Les antibiotiques sont utilisés en élevage dans un but thérapeutique, mais également incorporés à faible dose à l'alimentation, dans un but strictement zootechnique en vue d'améliorer les performances animales. Cette utilisation en tant que promoteur de croissance date des années 50, (Vanbelle, 2001). Cependant, depuis 1970, leur utilisation à cet effet, a été revue à la baisse suite aux dangers des résidus d'antimicrobiens présents dans les denrées alimentaires d'origine animale et suite à l'apparition de bactéries résistantes qui menacent l'homme

De ce fait, les mesures prises au niveau international vont dans le sens de la restriction, voire de l'interdiction totale de l'usage des promoteurs de croissance antibiotiques, comme c'est le cas en Suède depuis 1986 et au Danemark depuis 2000 (Gourmelen *et al.*, 2002). Cependant, depuis janvier 2006, l'interdiction totale de leur l'utilisation est effective (Dardenne *et al.* , 2005).

En vertu de ce règlement, seuls les additifs qui auront les limites maximales de résidus (LMR) fixées et qui auront fait l'objet d'une procédure d'autorisation, pourront être mis sur le marché (Gourmelen *et al.*, 2001).

Depuis quelques années, l'inocuité et la qualité des aliments d'origine animale constituent un sujet de préoccupation par le consommateur algérien, surtout après la vaste médiatisation du problème de la vache folle, et plus récemment de la grippe aviaire. Un risque plus inquiétant et plus courant menace le consommateur, mais peu ou pas connu par la société algérienne par manque d'information et de sensibilisation: la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes.

Même si les risques chimiques sont moins importants dans leurs conséquences immédiates, en comparaison de celles de certains risques microbiologiques, les résidus et les contaminants dans les denrées carnées doivent être rigoureusement contrôlés.

En Algérie, la recherche des résidus d'antibiotiques dans les viandes de poulet de chair a déjà été réalisée. Ces études réalisées avec des méthodes qualitatives, ont décelé des résidus sur les échantillons analysés sans toutefois quantifier leurs concentrations pour les comparer à leur limite maximale de résidus autorisée.

Notre travail a porté sur la recherche et la quantification des résidus d'antimicrobiens dans la viande de volaille type poulet de chair.

L'analyse a été réalisée sur trente (30) échantillons provenant d'un élevage privé de la wilaya de Bouira.

Notre étude a été réalisée avec deux méthodes :

- Microbiologique, par diffusion sur gélose.
- Chromatographie liquide par haute pression.

Le but de notre travail est la mise au point d'une méthode d'analyse pour quantifier les résidus d'antibiotiques en vue de juger de l'état de salubrité des produits avicoles commercialisés sur le marché, ainsi de contribuer à faire une évaluation du nombre et du type d'antibiotiques utilisés en élevage avicole.

Chapitre I : La production avicole dans le monde et rappels sur l'élevage du poulet de chair :

Partie 1 : La production avicole :

1. La production avicole dans le monde :

Après une année 2004 atypique marquée par l'extension de la grippe aviaire H5N1 en Asie du Sud-Est, la production mondiale de viande de volaille a augmenté en 2005. En effet, même si l'épizootie est loin d'être éradiquée et qu'elle s'est même étendue à la Russie et à l'Europe, la production est repartie à la hausse en Chine et en Thaïlande qui a converti une partie de son offre en produits cuits. La production a été également en forte croissance chez les deux plus gros fournisseurs mondiaux, le Brésil et les Etats-Unis, qui ont su répondre à une importante demande internationale. Ces deux pays couvrent désormais près des trois quarts ($\frac{3}{4}$) des exportations mondiales (Tableau I) (Office de l'élevage, 2006).

Tableau I: Les principaux pays producteurs de poulet de chair

Les nations	2001	2002	2003	2004	2005*	%05*/04
Etats unis	16998	17496	17686	18192	18752	+3.1
chine	12866	13523	13687	13220	13420	+1.5
UE**	9377	9366	9015	10969	11013	+0.4
Pays accédant à l'UE	1635	1765	1853	-	-	-
Moyen-Orient⁽¹⁾	4426	4432	4613	4776	4633	-3.0
Brésil	6919	7690	7910	8880	9703	+9.3
Europe de l'est⁽²⁾	390	414	410	467	461	-1.3
Japon	1184	1221	1240	1242	1123	-9.6
Russie	820	950	1035	1186	1280	+7.9
Thaïlande	1366	1445	1451	950	1000	+5.3
Total pays sélectionnés	58 865	61376	62068	63162	64728	+2.5
Total monde	71951	74612	76294	78559	80366	+2.3

Source: OFIVAL d'après GIRA, FAO, Commission européenne

* Estimations

** UE à 15 de 2000 à 2003, UE à 25 après 2003 à 2005

(1) Afrique du Nord incluse

(2) Roumanie, Bulgarie, Croatie, Bosnie, République Fédérale de Yougoslavie

Déjà altérée par la crise du Syndrome Respiratoire Aigue (SRAS) en 2003, la consommation du poulet de chair a stagné en Asie du Sud-Est, puis s'est encore détériorée en 2004 et 2005 suite à l'épidémie de grippe aviaire H5N1 qui a causé la mort de dizaines de personnes (environ 70 décès déclarés fin 2005) après leur contamination par des animaux infectés. Par contre elle a progressé dans plusieurs grands pays, y compris aux Etats-Unis, où elle est de loin la plus élevée au monde lorsqu'elle est ramenée par habitant (Office de l'élevage, 2006).

2. La production avicole en Algérie :

En Algérie, le secteur avicole a connu un lancement énorme résultant des politiques mises en œuvre par l'Etat au début des années quatre vingt, dans la perspective d'assurer l'autosuffisance alimentaire. Cette filière a subi des transformations importantes consécutives aux réformes économiques et au processus de libéralisation enclenchés depuis les années 90. La production avicole en Algérie est le fait d'éleveurs privés et d'entreprises publiques économiques. Toutefois, la production de ces dernières reste insignifiante par rapport à celle des exploitations privées qui représente 92 % de la production nationale en viandes blanches (Tableau II) (OFAL, 2000).

Tableau II: Structure de la production avicole en Algérie (OFAL, 2000)

Produits	Exploitations Etatiques		Exploitations Privées		Total	
	Production	%	Production	%	Production	%
Viandes blanches (Tonne)	12916	7.6	156266	92.4	169182	100

Mais, depuis des années, aucune évolution significative n'est apparue dans la structure des élevages privés et plusieurs anomalies sont à signaler telles:

- le sous investissement chronique en matière d'infrastructures et d'équipement.
- le non renouvellement des investissements réalisés.
- la simplification des itinéraires techniques. Exemple, la taille moyenne des ateliers d'élevage n'est que de 3000 à 5000 sujets de poulets de chair.
- La pratique saisonnière de l'élevage avicole, dictée par des considérations technologiques et commerciales (OFAL, 2000).

Trois postes grèvent les dépenses d'élevage avicole en Algérie; à savoir : l'aliment, le matériel biologique et les produits vétérinaires.

D'autre part, les conditions d'élevage étant inadéquates (ventilation statique, sous équipement chronique des ateliers, faible isolation des bâtiments, maîtrise insuffisante des conditions d'ambiance), conduisent à une faiblesse relative des performances zootechniques, ce qui entraîne l'allongement du cycle d'élevage, avec un gaspillage important et des taux de mortalité élevés (OFAL, 2000).

La disponibilité du poulet de chair et son prix raisonnable sont les facteurs qui ont toujours incité le citoyen algérien à s'orienter vers la consommation de cette viande, qui a connu une demande élevée au cours de ces dernières années, malgré les crises qui ont touché la filière (Tableau III).

Tableau III: Evaluation de la disponibilité de la viande blanche en Algérie

Années	1989	1996	1997	1998	1999	2000
Viandes blanches Kg/habitant/an	11.5	55.3	78.1	55.2	63.3	55.3

Source : OFAL, ESCAVI, 1999

Partie 2 : Rappels sur l'élevage de poulet de chair :

La filière avicole a connu un grand progrès, essentiellement du aux coûts réduits des financements et à la facilité de manipulation de l'élevage pendant une courte période de vie (Beaumont. C, 2004).

1. Les normes techniques :

Deux semaines avant la réception des poussins, l'accoureur prévoit le nettoyage du local et sa désinfection deux (02) fois, à huit (08) jours d'intervalle. Il doit commander l'aliment, installer la litière souple et épaisse (10cm), allumer la source de chaleur 24 heures avant l'arrivée des poussins et disposer les abreuvoirs autour de l'éleveuse (Ressources Animales, 2007).

1.1. L'alimentation :

L'organisme animal subit continuellement une perte d'énergie compensée par un apport alimentaire équilibré. Ce dernier est composé de substances variées et d'une quantité suffisante de matière protéique avec addition d'acides aminés (tryptophane, lysine, absentes dans le maïs), difficiles à trouver dans les matières premières disponibles (ITAVI, 2001) (Tableau IV).

Tableau IV: L'aliment destiné au poulet de chair durant les différentes phases d'âge

Période	Démarrage	Croissance	Finition
	1 ^{er} jour - 10 ^{ème} jour	11 ^{ème} jour - 42 ^{ème} jour	43 ^{ème} jour - 50 ^{ème} jour
Composition	Mais, tourteaux de soja, issus de meunerie, calcaire phosphate, sel, acides aminés, oligoéléments, poly vitamines.	Mais, tourteaux de soja, issus de meunerie, calcaire phosphate, sel, acides aminés, oligoéléments, poly vitamines.	Mais, tourteaux de soja, issus de meunerie, calcaire phosphate, sel, acides aminés, oligoéléments, poly vitamines.
	-Antioxydant : BHT et vitamines A,D ₃ ,E -Anticoccidien : sendramycine (aviax) -Antibiotiques : (facteur de croissance) bacitracine de zinc	-Antioxydant : BHT et vitamines A,D ₃ ,E -Anticoccidien : sendramycine (aviax) - Antibiotiques : (facteur de croissance) virginiamycine	-Antioxydant : BHT et vitamines A,D ₃ ,E -Anticoccidien : salinomycine (coxistac)

Source ONAB, 2003

* BHT : Buthylhydroxytoluène

1.2. Les traitements sanitaires :

La mise en place d'un plan de prophylaxie est obligatoire et doit comprendre deux catégories d'actions.

- Une prophylaxie hygiénique ou sanitaire qui impose le respect des normes d'hygiène quotidienne et des vides sanitaires entre les bandes.
- Une prophylaxie médicale qui fait appel à la prévention par la vaccination individuelle ou collective, ou par ajouts d'additifs chimiques dans l'alimentation.

Les principales pathologies rencontrées chez le poulet de chair sont :

- maladies virales : Gumboro, Newcastle, Bronchite infectieuse
- maladies infectieuses : Clostridie, Salmonelles
- autres : les carences.

Ci-dessous la synthèse des traitements préconisés en Algérie par les vétérinaires (Tableau V).

Tableau V: les traitements médicaux effectués aux poulets de chair

SEMAINES	MEDICATIONS
1ère semaine	Anti-stress + Antibiotiques (Néo-terramycine poudre) Vitamines AD ₃ E ; Vaccins : H120 (New Castel, Bronchite infectieuse)
2è semaine	Vitamines AD ₃ E + J ₇ Vaccin Gumboro
3è semaine	J ₁₉ Rappel vaccin New Castel, + Vitamines E J ₂₀ Anticoccidien (vetacox, perusil) J ₂₁ Rappel vaccin Gumboro
4è semaine	Vitamines B+ vitamines multi- oligoélément
5è semaine	J ₃₅ Rappel Gumboro + Vitamines B+ vitamines Multi- oligoélément Anti-stress
6è semaine	Vitamines B+ vitamines multi- oligoélément

2. La réglementation :

2.1. La réglementation Européenne :

Dans les années 40-50, l'industrie agro-alimentaire s'est mise à utiliser régulièrement des antibiotiques dans l'alimentation animale comme facteur de croissance pour accroître sa productivité. En élevage de rente l'usage des antibiotiques était autorisé sous deux types de statuts.

- en tant qu'additif dans un aliment supplémenté pour un effet facteur de croissance, ou en vue d'une prophylaxie anti-coccidienne chez certains groupes d'animaux (catégorie coccidiostatiques).
- en tant que médicaments vétérinaire dans un aliment, pour un traitement préventif ou curatif.
-

Dans certains pays, notamment aux Etats-Unis, le terme additif antibiotique vise toutes les utilisations, que ce soit à titre curatif, préventif, ou en tant que facteur de croissance (Devie et al; 2006).

Susceptibles d'entraîner des phénomènes de résistance chez l'homme, et des problèmes en terme toxicologique ou allergique, la Commission Européenne a décidé d'interdire les antibiotiques comme facteur de croissance (Tableau VI) pour le 1^{er} janvier 2006, ainsi la mise en oeuvre d'un plan de surveillance pour certaines substances et leurs résidus chez les animaux vivants et dans leurs produits.

D'autre part, le règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil fixe une procédure communautaire pour déterminer les limites maximales de résidus (LMR) dans les denrées alimentaires d'origine animale (Maghuin et *al.* ; 2001) afin d'assurer l'innocuité des antibiotiques pour le consommateur et l'animal.

Il existe quatre possibilités de classement de LMR (FNOSAD, 2004).

- Les substances ayant une LMR fixée définitivement
- Les substances non soumises à une LMR, réputées non ou peu toxiques.
- LMR fixées provisoirement (les substances présentent des lacunes ne permettant pas de fixer des LMR définitives et le fabricant dispose d'un délai (inférieur à 5 ans) pour combler ces lacunes.

Tableau VI: Textes officiels et interdictions concernant plusieurs catégories d'additifs en alimentation animale.

Texte officiel	Additif	Catégorie	Décision
Dir. 97/6 de la Commission du 30 janvier 1997	Avoparcine	Antibiotiques	Suspension depuis le 1 ^{er} avril 1997
Dir. 97/72 de la Commission du 15 décembre 1997	Ardacin	Antibiotiques	Suspension de l'autorisation provisoire depuis le 1 ^{er} avril 1998
Règlement (CE) 2821/98 du Conseil du 17 décembre 1998	Phosphate de tylosine Bacitracine zinc Virginiamycine Spiramycine	Antibiotiques	Suspension au 1 ^{er} juillet 1999
Règlement (CE) 2788/98 du Conseil du 22 décembre 1998	Olaquinox Carbadox	Facteurs de croissance	Interdiction au 1 ^{er} septembre 1999
Règlement (CE) 45/1999 de la Commission du 11 janvier 1999	Dinitolmide (DOT) Ipronidazole Arprinocide	Coccidiostatiques	Interdiction au 1 ^{er} octobre 1999
Règlement du Parlement Européen et du Conseil	Salomycine sodium Monensine sodium Flavophospholipol Avilamycine	Antibiotiques	Interdiction au 1 ^{er} janvier 2006

Source : (Devie et al ; 2006)

2.2. La réglementation Algérienne :

La demande en produits vétérinaires n'a pas cessé de croître depuis 1997 en relation avec l'essor notable de la production et la surmédicalisation des élevages avicoles en Algérie.

Légalement, seuls les vétérinaires et les techniciens vétérinaires sont autorisés à délivrer les médicaments. Cependant, il semble qu'en Algérie l'accès aux médicaments vétérinaires est facile et leurs disponibilités dans les marchés noirs, seraient à l'origine de leurs usages anarchiques et de l'automédication.

La liste des antimicrobiens autorisée en Algérie en tant que facteurs de croissance (Tableau VII) a toujours été limitée par rapport à la liste des antimicrobiens utilisés en thérapeutique (Tableau VIII)

Tableau VII: Les antibiotiques homologués en Algérie comme facteur de croissance

Groupe chimique	Molécule	Utilité
Polyéthers ionophores	Salinomycine, monensin de sodium Narasine, semduramycine	Coccidiostatique
Orthosomycines	Avilamycine	Additif
Glycophospholipides	Flavophospholipol	Additif

Source : (MADR 2003)

Tableau VIII: Les antibiotiques homologués en Algérie à usage thérapeutique

Famille	Molécule
Pénicilline	Amoxycilline, Ampicilline
Macrolides	Erythromycine, Spiramycine, Josamycine, Tilimicosine, Tylosine
Sulfamides et Diaminopyrimidines	Sulfadimérasine, Sulfadiméthoxine, Sulfaguanidine, Sulfaméthazine Sulfadiazine, Sulfaquinoxaline ,Sulfamethoxypyridazine,Sulfadimine, Triméthoprine
Tétracyclines	Tétracyclines, Chlortétracyclines Doxycycline, Oxytétracycline
Péptides	Colistine
Quinolones	Acide Oxolinique, Enrofloxacin, Fluméquine
Aminoside	Néomycine, Gentamycine

Source : (MADR, DSV, 2003)

Chapitre II : Les substances antimicrobiennes :

1. La définition des antimicrobiens :

On appelle « médicaments vétérinaires antimicrobiens », des substances naturelles semi synthétiques ou synthétiques qui affichent une activité antimicrobienne en tuant ou en inhibant la prolifération des microorganismes (Comité du codex alimentarius, 2005).

2. La nature des substances antimicrobiennes :

Il existe plusieurs types d'agents antimicrobiens à usages et actions variés. Parmi ces substances

2.1. Les antibiotiques :

2.1.1. La définition des antibiotiques :

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer les bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries ou d'origine synthétique ou demi synthétique (Bryskier, 1999).

2.1.2. La classification des antibiotiques :

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques et plusieurs types de classification sont possibles (chimique, mode d'action, spectre). Ces familles se distinguent par les propriétés physico-chimiques communes des molécules qu'elles contiennent. Chaque molécule dispose d'un mode d'action et d'un spectre propre à elle. (Tableau IX)

Tableau IX: les principales classes d'antibiotiques spectre et mode d'action

Famille	Mode d'action	Principaux groupes ou antibiotiques	Spectre
Acide fusidique	Inhibition de la synthèse des protéines	Acide fusidique	Étroit
Aminosides	Inhibition de la synthèse des protéines	Apramycine, Streptomycine Tobramicine, Gentamicine	Large
Bêta-lactamines	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Groupe de pénicilline G, (oxacilline), Céphalosporines de 1 ^{re} génération	Étroit
		Aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline Céphalosporines : 2 ^e , 3 ^e et 4 ^e génération	Large
Glycopeptides	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Teicoplanine, Vancomycine	Étroit
Macrolides	Inhibition de la synthèse des protéines	Érythromycine, Azithromycine,	Étroit
Nitrofuranes	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Furaltadone, Furazolidone	Large
Phénicolés	Inhibition de la synthèse des protéines	Chloramphénicol	Large
Polypeptides	Action sur la membrane externe des Gram-	Polymyxine B, Colistine, Bacitracine	Étroit
Quinolones et fluoroquinolones	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Acide calidixique, Acide oxolinique, Acide piromidique	Étroit
		Ciprofloxacine, Ofloxacine,	Large
Sulfamides	Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique	Sulfadiazine, Sulfadoxine, Sulfaméthoxydiazine Sulfaméthoxazole	Large
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse des protéines	Chlortétracycline, Doxycycline, Minocycline	Large
Fifamycines	Blocage de la synthèse des ARN messagers	Rifamycine SV, Rifaximine	Étroit
		Ripampicine	Large

Source : <http://www.bacterio.cict.fr/bactico/atbg/tablun.html>

2.1.3. L'usage des antimicrobiens en élevage avicole :

Les antimicrobiens sont très utilisés dans les différents types d'élevage. Sans eux, l'élevage industriel serait impossible et subirait d'énormes pertes.

Les objectifs recherchés dans l'usage des antimicrobiens sont de deux sortes:

- thérapeutiques
- zootechniques.

2.1.3.1. L'usage thérapeutique :

Les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique visant à l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou à la prévention d'une infection possible, lors d'un transport, d'une vaccination ou d'un stress (but prophylactique) (Chaslus-Dancla, 2001).

2.1.3.2. L'usage zootechnique :

Dans les années quarante et cinquante, l'industrie agro-alimentaire, s'est mise à utiliser régulièrement des antibiotiques dans l'alimentation animale comme facteur de croissance pour accroître sa productivité. Leur incorporation dans l'alimentation des animaux, permet une homogénéité des bandes avec un faible écart de poids entre les sujets et la production d'une même quantité de viande, en une période plus courte (Pederson et Edqvist, 2000).

L'effet de ce facteur de croissance implique la flore digestive. A très faible dose, les antibiotiques inhibent les bactéries de la flore intestinal qui catabolisent l'urée et les acides aminés. Ils augmentent ainsi la disponibilité des nutriments et l'énergie pour l'animal et réduisent la production d'ammoniaque, entraînant une diminution du taux de renouvellement de l'épithélium intestinal et épargnant de ce fait les nutriments (Corpet, 2000).

2.1.3.3. Les principaux antibiotiques utilisés dans les élevages avicoles :

L'usage des antibiotiques varie selon les pathologies rencontrées en cours d'élevage. Les plus utilisés sont :

a. Les beta-Lactaminees :

Les Beta-Lactamines représentent la première famille antibiotique administrée chez le poulet de chair. Ce sont des antibiotiques à spectre large et à action bactéricide. Ils sont fréquemment utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires ou comme additifs alimentaires (Biologie et recherche, 2005).

b. Les aminosides ou Aminoglycosides :

Les aminosides ont un spectre d'action étroit : ils inhibent la synthèse des protéines des staphylocoques et des bacilles Gram négatifs. Ils sont parfois utilisés en association avec la pénicilline. Ces antibiotiques, en particulier la néomycine, sont généralement plus toxiques que les autres. Leurs usage prolongé peut entraîner des effets secondaires tels : des atteintes du vestibule de l'oreille et/ou des atteintes rénales (Biologie et recherche, 2005).

c. Les macrolides :

Les macrolides sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre étroit, fréquemment utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires ou comme additifs alimentaires et promoteurs de croissance. Ils possèdent une excellente pénétration tissulaire et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Du fait de leur paroi, les entérobactéries sont naturellement résistantes aux macrolides (Biologie et recherche, 2005).

d. Les tétracyclines :

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques, avec un très large spectre d'activité. Elles pénètrent bien dans les cellules.

On distingue deux types de cyclines :

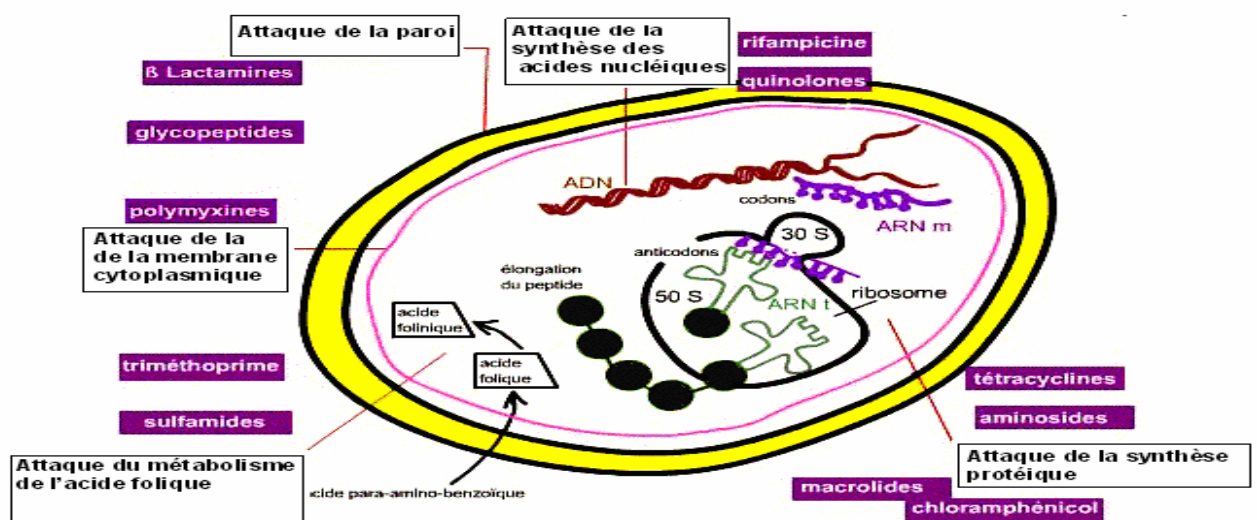
- les cyclines naturelles : chlortétracycline (Auréomycine®), Tétracycline.
- les cyclines semi synthétiques: Oxytétracycline actives sur souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles, elles ont une meilleure absorption digestive et une durée d'action plus longue (Bryskier, 1999).

2.1.3.4. Les modes d'action des antibiotiques :

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, ce qui implique le respect dans la prescription des données pharmacologiques de l'antibiotique, telles que la posologie, la voie d'introduction, la diffusion tissulaire et le métabolisme de la molécule.

Le mécanisme d'action des antibiotiques n'est pas toujours parfaitement élucidé, mais on distingue quatre grands modes d'action (Biologie et recherche; 2005) (Figure 1).

- action sur la paroi bactérienne ;
- action sur la membrane des cellules ;
- action sur l'ADN ;
- action sur le ribosome bactérien ou synthèse protéique.



Source : www-sante.ujf-grenoble.fr

Figure 1: Mode d'action des différentes familles d'antibiotiques

a. L'action sur la paroi :

Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi en inhibant la synthèse du peptidoglycane. La cellule s'allonge sans former de cloison, et explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Ces antibiotiques ne sont actifs que sur les bactéries en croissance (Euzeby, 2005). Ex : polypeptide (bacitracine), bêta lactamine (pénicilline, céphalosporine).

b. L'action sur la membrane des cellules :

Ils agissent sur les lipides membranaires et désorganisent la bicouche (phospholipidique), ce qui détruit l'intégrité membranaire. Ces molécules sont efficaces sur les germes en croissance et au repos. Ex : polypeptide (polymyxine, colistine) (Euzeby, 2005).

c. L'action sur l'ADN :

Les antibiotiques entravent la production de nouveaux chromosomes, certains bloquent les voies métaboliques en amont de la synthèse des acides nucléiques alors que d'autres agissent sur les enzymes qui en sont responsables.

Ces opérations vont entraîner :

- une inhibition de la RNA-polymérase : la rifampicine, fixe la sous unité bêta de la RNA-polymérase bactérienne, bloquant ainsi la transcription de l'ADN bactérien. Son action est bactéricide.
- une inhibition de l'ADNgyrase empêchant ainsi la réplication de l'ADN: ce mode d'action est caractéristique des quinolones.
- action sur la topologie de l'ADN
- inhibition de la réplication de l'ADN par blocage de l'activité de l'ADN polymérase. Ex : mixomycine .

d. l'action sur les protéines :

Les protéines sont nécessaires à la production de nouvelles bactéries. Certains antibiotiques nuisent à la capacité des bactéries à produire des protéines servant à la fabrication d'éléments importants pour la cellule (Euzeby, 2005).

Parmi ces antibiotiques:

- **Les aminoglycosides (la streptomycine)** : se fixe sur la petite sous unité des ribosomes, empêchant la traduction de l'ARN messager et conduisant à des erreurs de lecture donc de traduction.
- **Les phénicols (chloramphénicol)** : bloque la formation de la liaison peptidique. Il reconnaît le segment de la grosse sous unité du ribosome bactérien mais pas celui des ribosomes eucaryotes.
- **Les cyclines (tétracycline)** : en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome, elle bloque l'élongation de la chaîne polypeptidique.
- **Les macrolides (érythromycine)** : agit sur la partie 50S du ribosome et bloque l'élongation de la chaîne polypeptidique.

2.1.3.5. La pharmacocinétique des antibiotiques :

a. L'absorption :

C'est le processus conduisant au passage de l'antibiotique du site d'introduction dans l'organisme, à la circulation générale après avoir traversé une membrane biologique. L'administration par voie intraveineuse conduit à une absorption totale de l'antibiotique. Certaines classes d'antibiotiques ont une bonne absorption digestive (macrolides, tétracyclines, sulfamides) ; pour d'autres classes, l'absorption est nulle (aminosides, polypeptides) et la voie injectable est nécessaire pour obtenir un effet systémique (FMPMC, 2006).

b. La diffusion tissulaire :

L'antibiotique parvient au site de l'infection, suite à un ensemble de processus de répartition qui sont:

- une différence d'affinité entre protéines plasmatiques et protéines tissulaires : plus la fixation aux protéines plasmatiques est importante et forte, moins l'antibiotique peut diffuser dans les tissus car seule la forme libre est diffusable.
- liposolubilité : plus elle est importante plus le passage trans-membranaire est possible.
- irrigation des organes : plus l'organe est vascularisé, plus la distribution y est favorisée.

Pour le cerveau les antibiotiques non ionisés, liposolubles et de petite masse moléculaire, sont favorisés et peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique.

c. La biotransformation :

Les antibiotiques sont parfois modifiés dans l'organisme par les systèmes enzymatiques intestinaux, hépatiques ou rénaux. Les métabolites formés peuvent être inactifs et éliminés, ou être doués d'activités antibactériennes. Dans certain cas, la biotransformation au niveau intestinal a pour but d'activer l'antibiotique: lorsque l'antibactérien administré est sous forme de précurseur de l'antibiotique, on parle alors souvent de pro drogue (FMPMC, 2006). Le tableau X résume la pharmacocinétique de quelques antibiotiques.

d. L'élimination :

Elle peut être rénale ou hépatique :

- L'excrétion rénale se fait par filtration glomérulaire et sécrétion au niveau du tube contourné proximal avec parfois, possibilité de réabsorption tubulaire dépendante du pH urinaire.

Exemples d'antibiotiques excrétés par le rein : pénicillines, céphalosporines, aminosides, chloramphénicol.

- Au niveau hépatique, l'antibiotique est excrété par la bile avec possibilité de réabsorption intestinale par le biais du cycle entéro-hépatique.

Exemples d'antibiotiques éliminés par la bile : (ampicilline, rifamycine, macrolides)

- Il peut exister des excrétions par la salive ou les larmes, tels les macrolides (FMPMC, 2006).

Tableau X: Paramètres pharmacocinétiques de quelques antibiotiques

Antibiotiques	Absorption	Distribution	Elimination
Beta-lactamine Pénicilline	- Détruite par l'acidité gastrique (Administré une heure avant ou après repas.)	- Les pénicillines sont liées aux protéines plasmatiques à 60% - Diffusent facilement dans les espaces extracellulaires mais ne se concentrent pas dans les tissus.	- Rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. - La demi-vie d'élimination est généralement courte 30 minutes.
Macrolides Erythromycine	- Instabilité en milieu acide - Biodisponibilité médiocre selon le niveau de l'acidité gastrique.	- Molécules basiques et liposolubles. - Largement distribuées dans l'organisme. - Diffusent dans les tissus. - Diffusent aisément les membranes biologiques. - S'accumulent dans les compartiments cellulaires. - Se concentrent dans les tissus vascularisés.	- Biliaire après métabolisation hépatique. - l'érythromycine a une demi-vie courte.
Sulfamides	- Bien absorbés par voie orale.	- Diffusion dans les liquides interstitiels et le liquide céphalorachidien - Partiellement liés aux protéines plasmatiques	- Rénale, ce qui justifie leur utilisation dans le traitement des infections urinaires. - Une partie est préalablement métabolisée dans le foie.
Aminoglycosides Streptomycine	- Absorption orale est quasi nulle.	- Hydrophile. - Liaison aux protéines plasmatiques faible. - Pénètrent faiblement dans le liquide céphalo-rachidien. - Les cellules tubulaires proximales du rein et les cellules ciliées de la cochlée accumulent les aminoglycosides dont ils retiennent 5% de la dose administrée.	- Les aminoglycosides ne subissent aucune métabolisation, leur élimination est strictement rénale ($t_{1/2}$ 1.5h-3.5h)

Source : UCL: 05/08/2002

2.1.3.6. L'évaluation de l'activité des antibiotiques :

a. L'antibiogramme :

Le but de la réalisation d'un antibiogramme (Figure 2) est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques, dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique (Laure et *al*, 1995): bactérie sensible, bactérie intermédiaire, bactérie résistante.

On mesure le diamètre d'inhibition de chaque antibiotique (Figure 3), afin de déterminer la catégorie clinique de la bactérie à cet antibiotique testé (sensible, intermédiaire, résistant) et estimer la concentration minimale d'inhibition (CMI) (Girard et *al*, 2004).



Figure 2: Les zones translucides d'un antibiogramme



Figure 3: La lecture d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

CCI = c = concentration critique inférieure

CCS = C = concentration critique supérieure

D = diamètre critique supérieur

d = diamètre critique inférieur

b. La concentration minimale d'inhibition (CMI) :

C'est le paramètre le plus utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24 heures. Donc, la CMI explore seulement l'effet bactériostatique (Laure et *al*, 1995).

c. La concentration minimale bactéricide (CMB) :

Certains antibiotiques provoquent une mortalité bactérienne à partir d'une certaine concentration seuil. Cette bactéricidie s'effectue selon deux modalités (Laure, et *al*.; 1995).

- l'effet peut être proportionnel à la concentration d'antibiotique; on parlera alors de mortalité dépendante de la concentration ou "concentration dépendante"(Euzeby, 2005).
- l'effet est de type "tout ou rien" et la vitesse de mortalité est maximale dès que la concentration seuil de bactéricidie est atteinte. On parlera de mortalité dépendante du temps d'exposition ou "temps dépendant" (Euzeby, 2005).

2.1.3.7. L'association des antibiotiques :

Dans le but d'augmenter la bactéricidie, d'élargir le spectre antibactérien, voire de prévenir l'émergence de mutants résistants, les antibiotiques sont souvent utilisés en association afin :

- d'élargir le spectre d'activité dans les cas d'infections à germes multiples ;
- de traiter en urgence une infection grave non diagnostiquée ;
- de prévenir la sélection de mutants résistants lors des traitements de longue durée ;
- d'obtenir un effet synergique.

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

- indifférence : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre ;
- addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- synergie : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- antagonisme : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément (Burnichon ,2003).

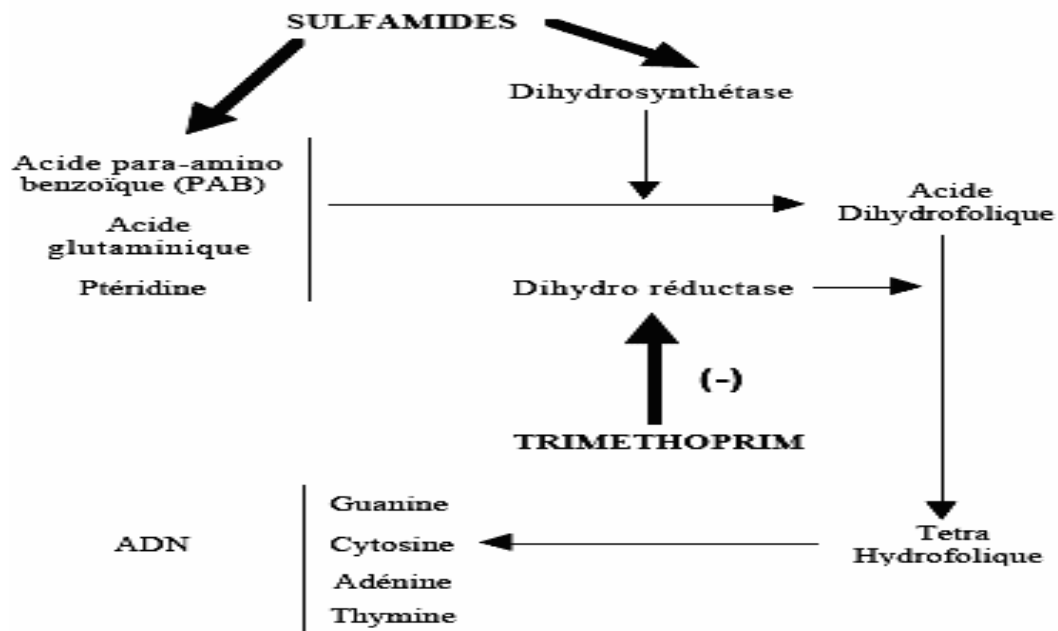
2.2. Les Sulfamides :

2.2.1. La définition:

Les sulfamides sont des anti-infectieux, doués de propriétés bactériostatiques à spectre relativement large. Ils sont en général, bien absorbés par voie orale et se distribuent largement dans tous les tissus, y compris dans le liquide céphalo-rachidien et synovial. Ils sont souvent associés à la triméthoprine en raison de leurs effets synergiques généralement dans un rapport de 5/1, ils deviennent fréquemment bactéricides et sont utilisés surtout dans le traitement des coccidioses (volailles, ruminants), ou des infections urinaires et digestives chez les carnivores (CBIPT, 2004).

2.2.2. Le mode d'action et métabolisme des sulfamides :

Les sulfamides sont des acides faibles qui agissent sur l'ADN car possédant une structure analogue à celles des molécules biologiques bactériennes. Ainsi, la cellule va les reconnaître et les intégrer dans son métabolisme; ils vont alors agir par inhibition compétitive à l'incorporation de l'acide para-amino-benzoïque (PABA) dans la synthèse d'acide folique. La cellule meurt par carence en bases nucléiques (CBIPT, 2004) (Figure 4).



Source : (CBIPT, 2004)

Figure 4: Mode d'action des sulfamides

3. Les risques présentés par l'usage des antimicrobiens :

Les risques d'usage d'antimicrobiens dans les élevages avicoles sont de deux types :

- présence des résidus dans les viandes,
- acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries.

3.1. La présence des résidus :

3.1.1. La définition de résidus :

Les résidus sont des substances pouvant apparaître dans les denrées alimentaires par suite à l'utilisation de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires. Il s'agit de traces indésirables de médicaments, de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci, dans le produit final. Parmi ces médicaments utilisés : les antimicrobiens (ACIA, 2005).

3.1.2. Les causes de la présence des résidus dans la viande :

Les médicaments vétérinaires, utilisés conformément au mode d'emploi, ne devraient pas entraîner la présence des résidus dans les viandes.

Les causes possibles de tels résidus sont :

- l'inobservation de la dose ou du mode d'emploi recommandés sur l'étiquette ;
- le non-respect des délais d'attente exigés;
- l'utilisation de matériel contaminé ou incorrectement nettoyé;
- la contamination de l'environnement (Chataigner et *al*, 2003).

3.1.3. Les préoccupations :

Bien que la contamination microbienne des aliments continue d'être la cause de la majorité des cas de maladie, l'inquiétude des consommateurs persiste concernant les résidus chimiques présents dans les aliments (Santé Canada, 2002).

La présence possible de résidus d'antibiotiques dans les viandes soulève des préoccupations, parmi lesquelles :

- les réactions allergiques chez les personnes sensibilisées. La pénicilline, qui cause les réactions indésirables les plus graves, est impliquée plus fréquemment que tous les autres antimicrobiens réunis;
- les résidus peuvent avoir des effets toxiques directs et aigus, tel le chloramphénicol qui est un antibiotique interdit depuis 1995 en Europe (SIMV, 2003);
- l'exposition à de faibles concentrations de certains composés chimiques sur des périodes prolongées pourrait entraîner une toxicité chronique. Cette préoccupation vise principalement les produits cancérigènes et ceux qui s'accumulent dans les organismes vivants, telle la furazolidone interdite depuis 1994 en Europe (Afssa, 2004).

3.2. L'acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries:

La résistance des bactéries à un antimicrobien est un mécanisme que la bactérie met en place pour neutraliser l'effet de l'antibiotique se trouvant dans son milieu de vie.

Il y'a deux types de résistance :

- une résistance naturelle;
- une résistance acquise.

3.2.1. La résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de la même souche. Elle est stable et possède un support génétique transmis à la descendance mais peu ou pas transmissible sur un mode horizontal.

Exemple: Les bacilles à gram négatif (Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*) sont naturellement résistants, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolide, rifampicine, vancomycine) parce que ces antibiotiques ne traversent pas la membrane externe de la paroi (Euzéby; 2005).

3.2.2. La résistance acquise :

La résistance acquise est due à l'acquisition d'information génétique exogène portées par des plasmides ou des transposons. Ces modifications du capital génétique permettront à la bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce.

La généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes (Biologie et recherche, 2003).

3.3 . Les modalités de résistance des bactéries :

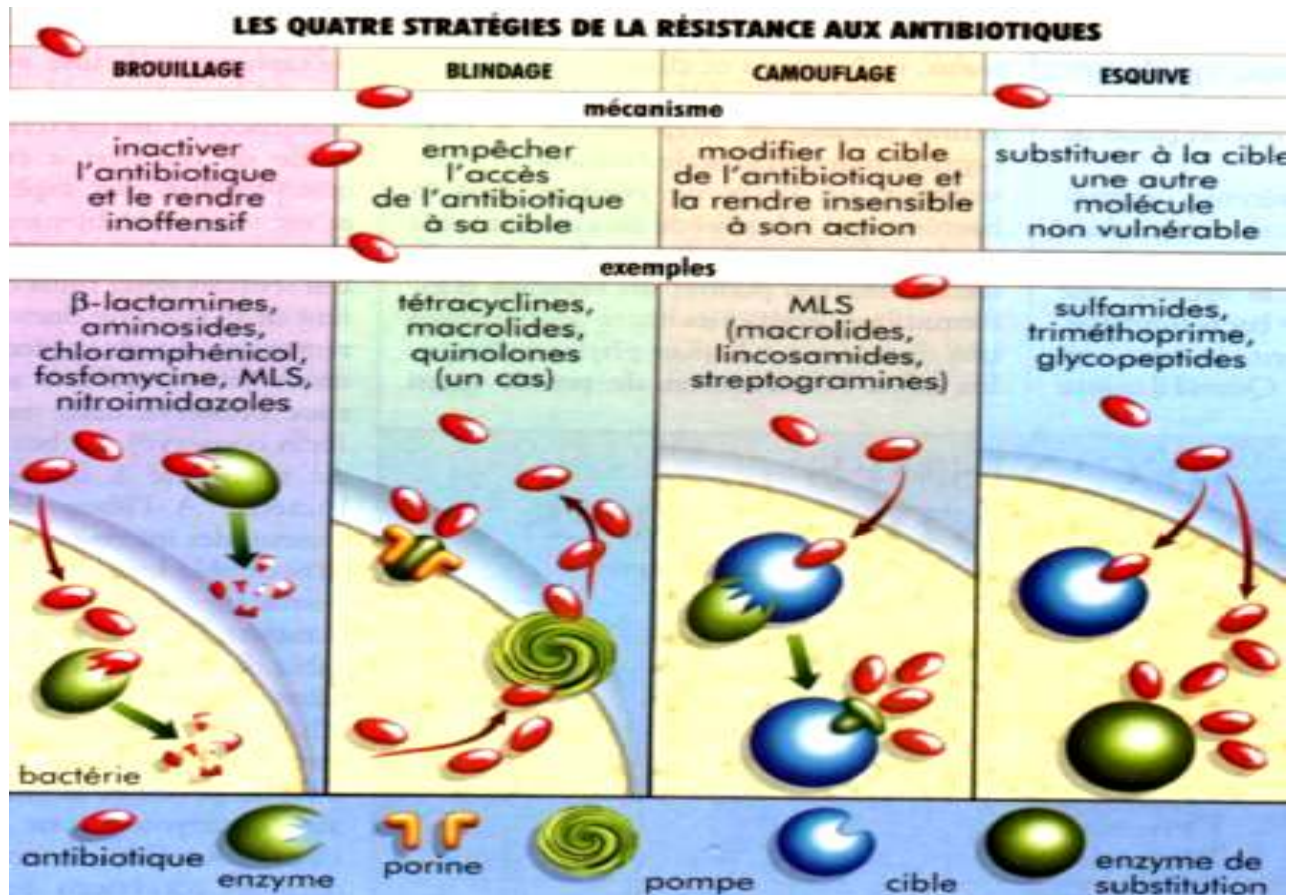
Pour contrer l'action des antibiotiques, les bactéries utilisent deux types de mécanismes :

- mécanismes biochimiques
- mécanismes génétiques

3.3.1. Les mécanismes biochimiques de résistance :

Il existe quatre stratégies qui sont de mieux en mieux connus. La figure 5 les illustre (Euzéby, 2005).

- a. **Le brouillage** : la bactérie synthétise des protéines (enzymes) pouvant séquestrer l'antibiotique ou le dégrader pour le rendre inoffensif (hydrolases, transférases). Ce brouillage peut se faire à l'extérieur de la cellule comme à l'intérieur (Euzéby, 2005).
- b. **Le camouflage** : la bactérie peut modifier la cible de l'antibiotique. Celle-ci n'est pas reconnue et lui devient insensible (Euzéby, 2005).
- c. **Le blindage** : la bactérie empêche l'accès de l'antibiotique aux cibles intracellulaires par deux modalités possibles (Euzéby, 2005).
 - modification de la perméabilité membranaire.
 - mise en place d'un système d'expulsion de l'antibiotique.
- d. **L'esquive** : la bactérie substitue une autre molécule à la cible. L'antibiotique, en se fixant sur ce leurre, ne remplit pas son rôle (Euzéby, 2005).



Source : <http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/images/image033.jpg>

Figure 5: Modalité de résistance chez la bactérie

3.3.2. Les mécanismes génétiques de résistance :

Les mécanismes de résistance sont parfois dus à l'existence de certains gènes qui, soit produisent des enzymes capables de dégrader les antibiotiques, soit sont responsables de modifications intracellulaires les rendant inopérants.

Ces gènes de résistance peuvent être portés sur le chromosome principal de la bactérie ou sur des entités génétiques appelées plasmides, transposons ou intégrons. Le transfert de gènes de résistance ne se fait pas seulement par transfert vertical, mais se fait principalement selon trois axes horizontaux (transformation, transduction et conjugaison). Ce transfert horizontal permet une diffusion extrêmement rapide des informations génétiques. La figure 6 schématise le réseau de transfert de la résistance à l'homme (SFM, 2006).

a. La transduction :

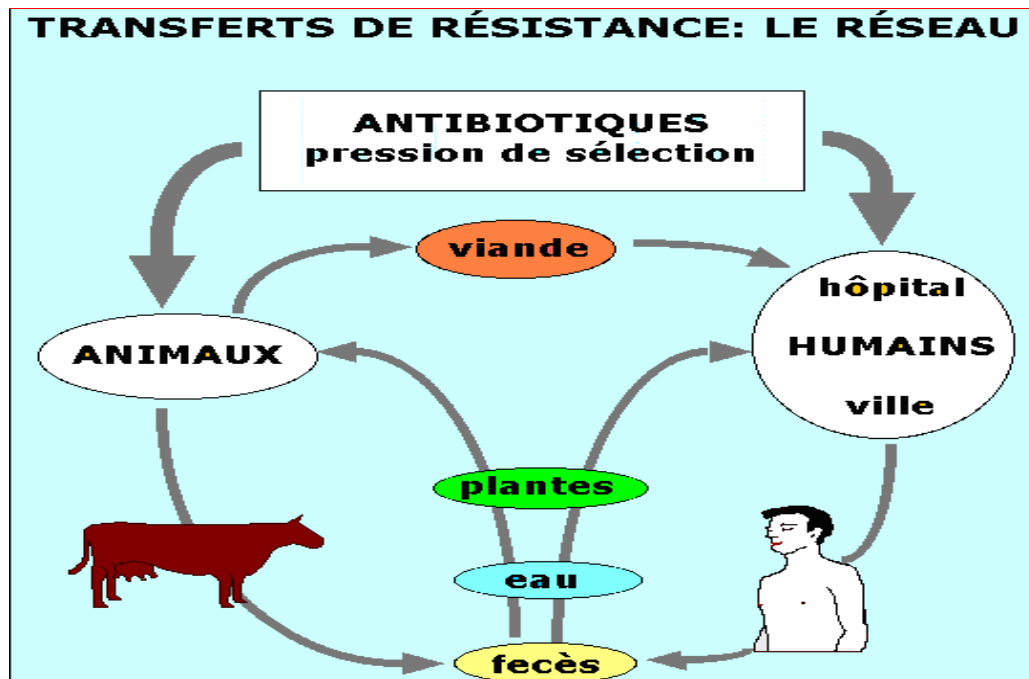
Dans la transduction, le vecteur permettant d'insérer un fragment d'ADN dans une cellule hôte est un bactériophage (virus bactérien). En se répliquant, le virus intègre son ADN à celui de la bactérie. Lorsqu'il la quitte, il emporte avec lui cet ADN contenant parfois quelques gènes de résistance. Comme le bactériophage attaque bon nombre de bactéries, il les transmettra à d'autres bactéries (SFM, 2006).

b. La transformation :

La transformation permet l'acquisition et l'intégration d'ADN nu. Cet ADN « libre » peut, par exemple, provenir d'une bactérie morte. Étant à l'extérieur il est alors capté par une autre bactérie et incorporé à son ADN. Si des gènes de résistance étaient présents dans l'ADN nu, ils pourront être transmis (SFM, 2006).

c. La conjugaison :

C'est le mécanisme le plus fréquent et le principal responsable des transferts horizontaux. L'ADN est transféré d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice par simple contact des membranes cellulaires.



Source : Faye, 2005

Figure 6: Réseau de transfert de résistance à l'homme

Chapitre I : Matériel :

Notre étude porte sur la recherche des résidus de quatre familles d'antibiotiques dans le muscle de poulet de chair : les bêta-lactamines (pénicilline G) ; les sulfamides (sulfadimirazine), les macrolides (érythromycine) et les aminosides (streptomycine).

Les analyses sont réalisées au sein du service bactériologique alimentaire et du service toxicologie, du Laboratoire Central de l'Intendance Militaire sis à El Harrach sur une période s'étalant de février à juillet 2006.

A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes :

- une méthode microbiologique : c'est une méthode officielle de contrôle utilisée dans les laboratoires belges (laboratoire de fougères). (Fabre., 2003).
- une méthode de chromatographie liquide haute pression : méthode utilisée dans les laboratoires de L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) (Fabre., 2003).

1. Le matériel de la méthode microbiologique:

1.1 . Le matériel biologique :

1.1.1. La viande blanche :

Un seul type de viande a fait l'objet de notre étude. Il s'agit de viande blanche de volaille type « poulet de chair », composée de 30 échantillons provenant d'une tuerie privée située à la commune de Hammadi, wilaya de Boumerdes.

1.1.1.1. L'origine des échantillons :

Les 30 échantillons sont issus d'un élevage privé situé dans la région de Bouira, composé de 2500 sujets. Le poids total des 30 échantillons est égal à 76 Kg, soit une moyenne de 2,5 Kg /sujet.

1.1.1.2. Le prélèvement des échantillons :

Nos prélèvements sont réalisés en deux étapes :

- première étape : juste après l'abattage, prélever **30** carcasses de poulet de chair entières, les placées dans un congélateur puis les transportées au laboratoire.
- deuxième étape : à l'aide d'un matériel stérile (pince, couteau), prélever **500 g** de muscle du bréchet, mettre dans des sacs stériles et conserver ensuite dans le congélateur.

1.1.2. les micro-organismes utilisés :

Pour rechercher les quatre familles d'antibiotiques, notre travail nécessite l'utilisation des micro-organismes suivant (Tableau XI).

- **Bacillus subtilis** (Ref : BGA 935/2) Température d'étuvage (+ 30° C).
- **Micrococcus luteus** (Ref : TCCA 697/2) Température d'étuvage (+ 37° C).

Tableau XI: Familles d'antibiotiques tests en fonction des souches et du pH du milieu

Micro-organisme	pH du milieu	Antibiotiques recherchés
Bacillus subtilis	6,0	Béta-lactamine Tétracycline
	7,2	Sulfamides
	8,0	Aminosides
Micrococcus luteus	8,0	Béta-lactamine Macrolide

1.2. Les produits chimiques et réactifs :

1.2.1. Les milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation de notre recherche sont :

- **Test agar à pH 6** : c'est un milieu solide, utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques à caractère légèrement acide tels les bêta-lactamines et les tétracyclines.
- **Milieu Mueller-Hinton à pH 7,2**: c'est un milieu solide, utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques à caractère neutre tels les sulfamides.
- **Milieu Mueller-Hinton à pH 8** : nous avons utilisé la potasse (KOH) pour ajuster le milieu Mueller-Hinton à **pH 7,2** afin d'avoir un milieu à **pH 8**, permettant la recherche des germes sensibles aux antibiotiques à caractère légèrement basique.
- **Bouillon tripticase soja** : C'est une gélose utilisée pour préparer le bouillon de culture des germes exigeants.

1.2.2. Les réactifs :

- **La potasse** : KOH pour ajuster le **pH 7,2** du milieu Mueller-Hinton à **pH 8**.

1.2.3. Les antibiotiques :

Les antibiotiques utilisés, été sous deux formes :

- Trois antibiotiques sous forme de disque:
 - Pénicilline G sodique, 10 UI
 - Erythromycine, 15 UI
 - Sulfamide, 250 µg
- Deux antibiotiques sous forme déshydratée à usage de laboratoire:
 - Dihydro-streptomycine ref : EC 226-823-7
 - Triméthoprime ref : T 7883

1.3. L'appareillage : Voir annexe (1)

2. Le matériel de la méthode chromatographique :

L'analyse chromatographique est réalisée sur un appareil équipé d'un détecteur UV visible pour quantifier la concentration des résidus d'antibiotiques identifiés avec la méthode microbiologique.

2.1 . L'appareillage :

- Tubes à centrifuger
- Fioles jaugées en verres
- Agitateur pour tubes à essai, type vortex
- Centrifugeuse
- Broyeur (Hachoir)
- Balance de précision
- Cuve à ultrason
- Pipettes automatiques
- Tubes à essai
- Entonnoir
- Pipette graduée
- Micro seringue

2.2 . Les réactifs :

Les produits chimiques et les solvants utilisés sont des réactifs de qualité appropriée pour l'analyse. Durant toute l'expérimentation, nous avons utilisé une eau bidistillée.

Les solutions nécessaires au traitement des échantillons sont préparées avec les produits chimiques suivants:

- | | |
|---|---------|
| - Acétonitrile | Merck |
| - Méthanol | Merck |
| - Acide trichloracétique | Prolabo |
| - Acide oxalique dihydraté | Prolabo |
| - Acide citrique monohydraté | Merck |
| - Hydrogénophosphate disodique anhydre | Merck |
| - Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) | Prolabo |
| - Sel disodique dihydraté | Prolabo |
| - Poudre florisil | Prolabo |

Chapitre III : Les méthodes de dépistage des résidus :

Malgré le nombre croissant de méthodes analytiques disponibles pour détecter les résidus d'antimicrobiens dans l'alimentation humaine, on note l'absence de techniques rapides, fiables et automatisées dans les laboratoires d'analyses. La gestion des résidus chimiques dans les aliments d'origine animale est une vieille problématique basée sur des tests d'inhibition microbiens (sensibilité insuffisante) et nécessitant des temps d'incubation très long. D'autres méthodes plus sensibles ont été développées en alternative (les tests immunologiques) mais leurs reproductibilités et automatisations sont faibles (Maghuin et *al.* ; 2001) .

En conséquence, le développement de méthodologies analytiques appropriées reste d'actualité (Gateman, 2004).

Trois problèmes majeurs se posent lors de l'analyse des résidus d'antibiotiques :

- absence de méthodologie de dosage commune aux antibiotiques en raison de leur différence de structure.
- les matrices d'intérêts sont très complexes et variées (ex : muscles, graisse, lait, reins).
- les méthodes doivent être quantitatives car les teneurs en résidus sont réglementées par des LMR qui varient énormément selon les substances et les matrices (Edder, 2002).

Parmi ces méthodes, nous avons :

1. La méthode microbiologique :

1.1 . La diffusion sur gélose :

Elle est qualitative, basée sur la diffusion des antibiotiques contenus dans un échantillon de viande (ou dans d'autres produits alimentaires d'origine animale), au contact d'un milieu gélosé (tryptophane soja) préalablementensemencé dans la masse par une suspension d'une souche sensible. Le milieu est incubé à la température idéale de la souche test. Une inhibition de la croissance de cette souche traduit la présence d'antibiotiques (Guiraud, 1998).

Cette méthode sera développée dans notre partie expérimentale.

1.2 . La technique en milieu liquide (Méthode d'acidification) :

Elle est utilisée essentiellement pour la recherche de résidus d'antibiotiques dans le lait après pasteurisation (Multon, 1991).

2. La méthode immunologique :

Il existe plusieurs tests immunologiques rapides qui détectent les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires.

2.1 . Radio Immuno Assay (Tests RIA):

C'est la reconnaissance de la molécule par un anticorps marqué avec un isotope radioactif. Avec cette technique, on mesure la radioactivité liée aux anticorps après avoir éliminé la radioactivité libre.

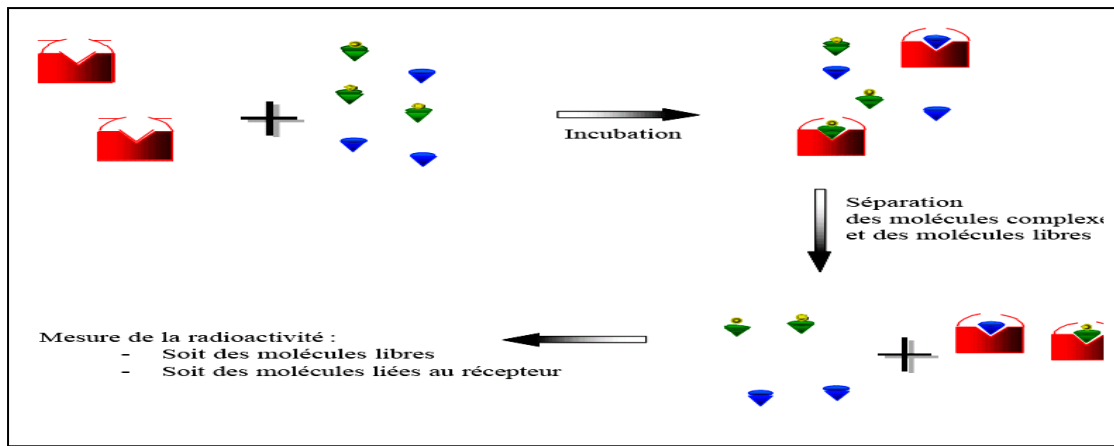
Ces méthodes permettent de détecter des concentrations en résidus de l'ordre du ppb (microgramme par kg) dans les échantillons de lait, de viandes, dans les oeufs et dans les fluides biologiques (Maghuin. R, 2005).

2.2 . Radio Récepteur Assay (RRA) :

Cette fois l'antigène est marqué par une enzyme dont l'activité liée aux anticorps peut être mesurée grâce à une coloration correspondant à la transformation du substrat de l'enzyme en produit. Cette méthode permet de détecter les β lactames, les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides et le chloramphénicol dans les échantillons de lait, de viandes, dans les oeufs et dans les fluides biologiques. La figure 7 en résume le principe.

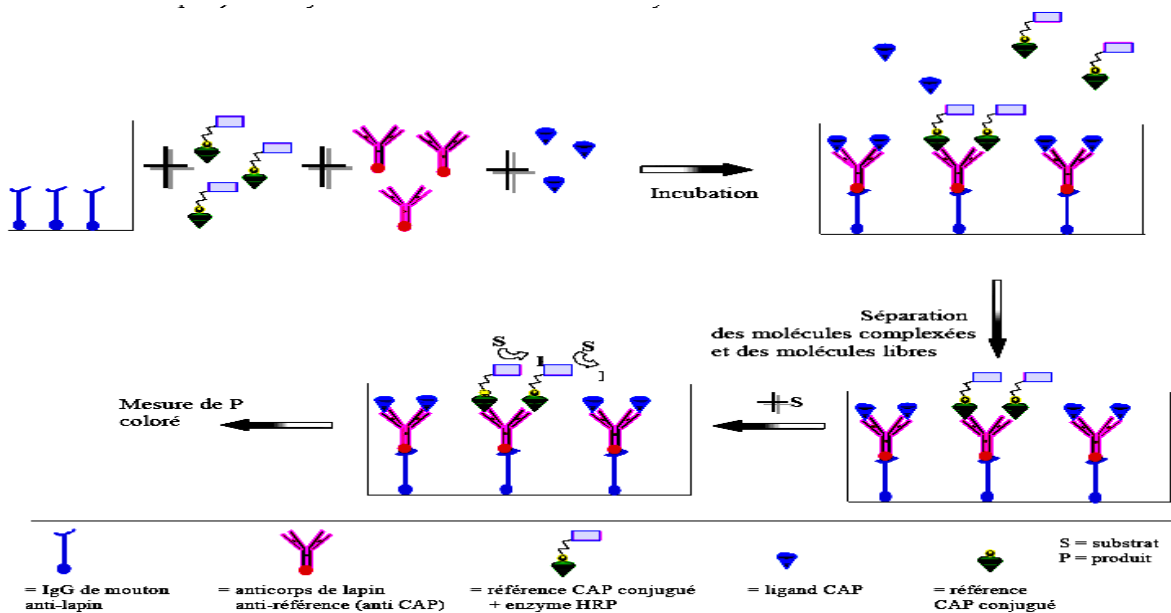
2.3 . Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):

Le test ELISA se base sur le même principe que le RIA, mis à part le fait que le marquage est enzymatique au lieu d'être radioactif. Les résultats finaux obtenus sont basés sur un changement de couleur (Maghuin et al, 2001) (Figure 8).



Source : (Maghuin et al, 2001)

Figure 7: Principe du Radio Immuno Assay et du Radio Récepteur Assay



Source : (Maghuin et al, 2001)

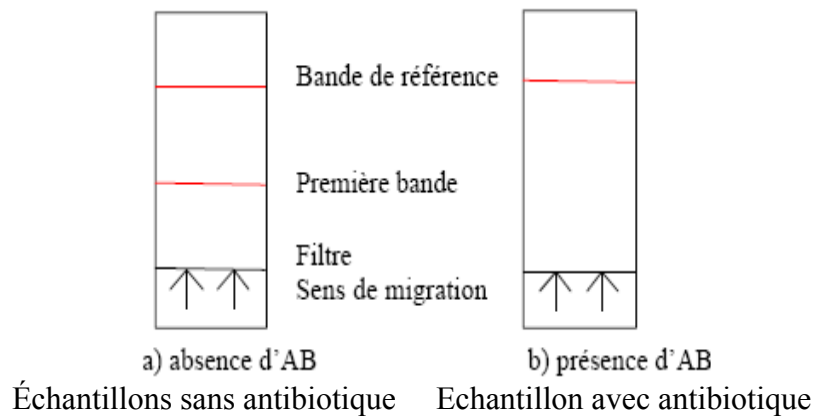
Figure 8: Principe Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

2.4 . Le test Penzym :

C'est un test qualitatif se basant sur une réaction enzymatique et colorimétrique. Très utilisé dans l'analyse du lait, il ne peut être pratiqué tel quel pour le jus de viande. En effet, ce dernier, se basant sur une réaction colorimétrique, il est nécessaire de décolorer totalement la solution d'extrait viande (Maghuin et al., 2001).

2.5 . Le test β -STAR :

Il est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Au cours de la première incubation, les antibiotiques du type β -lactames présents dans l'échantillon se lient au récepteur. Pendant la deuxième incubation, l'échantillon migre sur un support immuno-chromatographique présentant deux bandes de capture. La première bande retient tous les récepteurs non liés aux antibiotiques et la seconde permet de contrôler le bon déroulement du test (bande de référence). Plus il y aura d'antibiotiques présents dans l'échantillon, moins il y aura de récepteurs libres susceptibles de migrer sur le support et donc, la première bande de capture sera moins visible (Maghuin et *al*, 2001). (Figure 9)



Source : (Maghuin et *al*, 2001)

Figure 9: Principe du B-STAR 100

3. La méthode physico-chimique :

3.1 . La chromatographie liquide haute pression (HPLC)

C'est une technique d'identification et de quantification permettant la séparation des molécules analysées. Elle est fréquemment utilisée en biochimie ainsi qu'en chimie analytique (Maghuin. et *al*, 2001). C'est la deuxième méthode que nous avons utilisée dans notre partie expérimentale; elle sera développée ultérieurement.

Chapitre II : Méthodes :

1. La méthode microbiologique :

Pour la méthode microbiologique, nous avons appliqué le test des quatre boîtes sur gélose.

1.1 . Le but :

Identifier les résidus de quatre antibiotiques suivant : pénicilline G, streptomycine, érythromycine, sulfadimirazine.

1.2 . Le principe :

- ensemercer les micro-organismes test dans des milieux nutritif à pH (6.0 ; 7.2 ; 8.0) ;
- déposer des disques d'échantillon de muscle congelé à la surface du milieuensemencé ;
- incuber les boîtes de pétri ; la substance a activité antibiotique éventuellement présente dans les disques d'échantillon, diffuse concentriquement sur la gélose et inhibe la croissance des micro-organismes test. Il en résulte la formation d'une zone d'inhibition translucide autour de l'échantillon.

1.3 . L'application :

1.3.1. La remise en activité des micro-organismes test :

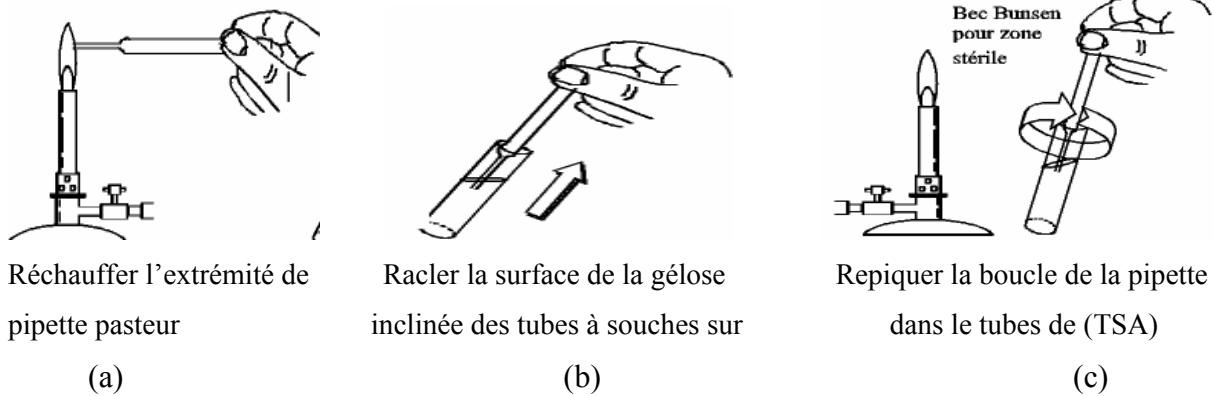
Mettre 5 ml de bouillon nutritif trypticaseine soja (TSA) dans deux tubes stériles. A l'aide d'une anse en acier, on fait des raclages à la surface de la gélose inclinée d'un tube contenant des spores de *Bacillus subtilis*. Repiquer ensuite la boucle de cette anse dans le premier tube contenant 5 ml de TSA et tourbillonner avec l'agitateur (Figure 10).

Refaire la même opération pour *Micrococcus luteus* en utilisant une autre pipette pasteur et la repiquer dans le deuxième tube.

Procéder à l'incubation des deux tubes dans les étuves correspondantes:

- Tube *Bacillus subtilis* à (+30° C) pendant 24h
- Tube *Micrococcus luteus* à (+37° C) pendant 18h

Ces cultures représentent les solutions mères.



Source: www.georges.dolisi.free.fr

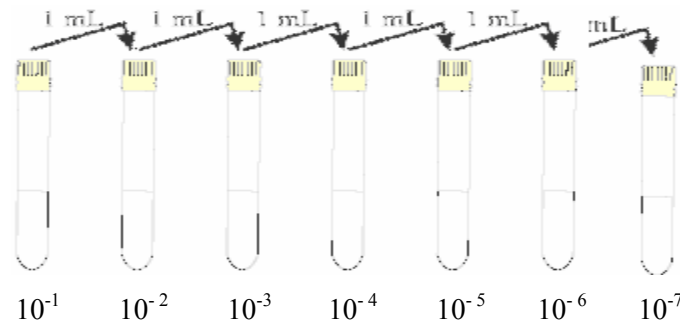
Figure 10: Les étapes de l'activation des souches

1.3.2. La préparation de l'inoculum :

Elle permet d'avoir une culture d'épreuve en réalisant une série de dilution (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7}) des solutions mères à souches préparées auparavant.

1.3.2.1. Les dilutions des solutions mères :

- Faire une rangée de sept (7) tubes stériles pour réaliser les dilutions de *Bacillus subtilis*.
- Ecrire la souche et la dilution sur chaque tube,.
- Pipeter 9 ml d'eau physiologique dans les 7 tubes.
- Pipeter 1 ml de la solution mère de *Bacillus subtilis* dans le premier tube de la rangée qui correspondra à la dilution de 10^{-1} de la solution mère de *Bacillus subtilis*.
- A l'aide d'une nouvelle pipette graduée, transférer 1 ml de la première dilution 10^{-1} de la solution mère de *Bacillus subtilis* dans le deuxième tube. On aura une dilution de 10^{-2} .
- Poursuivre la même opération pour les autres tubes jusqu'à atteindre la dilution 10^{-7} de la solution mère de *Bacillus subtilis*. (Figure 11).
- Refaire la même opération pour la solution mère de *Micrococcus luteus*.



Tubes de diluant de 9 ml d'eau physiologique

Source: www.georges.dolisi.free.fr

Figure 11: Les dilutions de la solution mère de BS pour la recherche de l'inoculum

1.3.2.2. L'ensemencement des dilutions sur gélose Triptocaseine soja :

- Prendre les 7 tubes de la première rangée des dilutions de *Bacillus subtilis*.
- Prendre une série de 7 boîtes de pétri, y inscrire sur le verso:BS et la dilution correspondante.
- Pipeter 1 ml de chaque tube de la rangée de *Bacillus subtilis* dans la boîte de pétri correspondante puis verser 15 ml de TSA dans les sept boîtes de pétri.
- Refaire la même opération pour *Micrococcus luteus*.
- Incuber les boîtes de pétri dans les étuves:
 - Boîte de pétri de *Bacillus subtilis* à (+30° C) pendant 24h.
 - Boîte de pétri de *Micrococcus luteus* à (+37° C) pendant 16h à 18h.

1.3.2.3. Le dénombrement :

Faire la lecture des boîtes de pétri, pour chercher la dilution de l'inoculum à densité de 10^5 spores /ml.

- o Pour *Bacillus subtilis*, nous avons utilisé à la place de l'inoculum préparé; une ampoule de 1 ml contenant 10^6 colonies, dans un litre de gélose.
- o Pour *Micrococcus luteus*, l'inoculum correspond à la dilution 10^{-1} .

1.3.3. La recherche de résidus d'antibiotiques dans le muscle :**1.3.3.1. La préparation des géloses :** Voir annexe (2)

- Test agar à pH 6
- Mueller Hinton à pH 7,2
- Mueller Hinton à pH 8

1.3.3.2. La préparation des solutions d'antibiotiques témoins :

Nous avons préparé uniquement deux solutions d'antibiotiques (Triméthoprim, Dihydrostreptomycine), les autres antibiotiques ayant été conditionnés sous forme de disque.

1.3.3.2.1. La préparation de la solution Triméthoprim :

- Dissoudre 50 mg de Triméthoprim dans 5ml d'acide acétique à 5%.
- Ajuster avec 500 ml d'eau distillé : c'est la solution mère. Peut être conservé 14jours, à (+4° C).
- Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère à 1/20. La concentration finale sera de 0,005 mg / ml.

1.3.3.2.2. La préparation de la solution Dihydrostreptomycine :

- Dissoudre 64 mg de Dihydrostreptomycine dans 50ml d'eau distillé.
- Au moment de l'emploi, diluer cette solution mère à 1/200. La concentration finale sera de 0,0064 mg / ml.

1.3.3.3. La préparation des boîtes de Pétri :

- Prendre 0,2 ml (l'inoculum) de l'ampoule de *Bacillus subtilis* (10^6 / l de gélose), l'ajouter aux 200 ml de gélose à pH 6,0.
- Prendre 0,2 ml (l'inoculum) de la même ampoule de *Bacillus subtilis*, la rajouter aux 200 ml de gélose à pH 7,2. Ajouter 10 µl de la solution de triméthoprimine pour la détection des sulfamides grâce à la synergie triméthoprimine-sulfamides.
- Prendre 0,1 ml (l'inoculum) de la même ampoule de *Bacillus subtilis*, l'ajouter aux 100 ml de gélose à pH 8,0.
- Prendre 1 ml de l'inoculum de *Micrococcus luteus* (dilution 10^{-1}), et l'ajouter à 150 ml de gélose à pH 8,0.
- Agiter les flacons et réaliser rapidement l'étape suivante pour éviter la solidification des géloses.
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 6,0 dans les boîtes de Pétri identifiées par leur verso (BS, pH 6).
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 7,2 dans les boîtes de pétri identifiées par leur verso (BS, pH 7,2).
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 8,0 dans les boîtes de pétri identifiées par leur verso (BS, pH 8,0).
- Pipeter 15 ml de gélose à pH 8,0 dans les boîtes de pétri identifiées par leur verso (ML, pH 8,0).

1.3.3.4. Le traitement des échantillons :

- Retirer les échantillons du congélateur, les déposer sur un plateau en acier inoxydable.
- Faire des raclages à la surface du muscle pour éliminer les impuretés.
- Prélever, à l'aide d'un emporte-pièce sur le premier échantillon de muscle, une carotte cylindrique de 8mm de diamètre et 2cm de long environ.
- Pousser le cylindre de muscle du premier échantillon hors de l'emporte-pièce; découper avec une lame de bistouri huit rondelles de 2mm d'épaisseur.
- A l'aide d'une pince, placer deux rondelles du premier échantillon en position diamétralement opposées sur chaque boîte de pétri (3 boîtes de pétri pour *Bacillus subtilis* à pH 6,0; pH 7,2; pH 8,0 ; et une boîte pour *Micrococcus luteus* à pH 8,0).
- Stériliser l'emporte-pièce à la flamme et refaire la même opération pour les autres échantillons de telle sorte à avoir deux échantillons par boîte de pétri (Figure12).
- Tous ces disques doivent se situés à 1 cm de la périphérie de la boîte.
- Placer les disques d'antibiotiques au milieu des boîtes de pétri, selon le pH.
- Incuber les boîtes de pétri dans les étuves :
 - *Bacillus subtilis* à 30° C pendant 24h
 - *Micrococcus luteus* à 37° C pendant 18 h.
- Faire la lecture des boîtes pour voir les zones d'inhibition



Figure 12: Disposition des échantillons sur la boîte de Pétri

2. La méthode chromatographique :

Elle permet l'identification et le dosage des antibiotiques détectés avec la méthode microbiologique. La limite de détection a été validée à 25µg /Kg. D'après le Règlement fixées par CEE n° 2377/90 du Conseil du 4 mars 1999, la limite maximale de résidus dans le muscle pour la pénicilline G (LMR) est fixée à 50µg/Kg, et pour l'érythromycine, à 100µg/Kg d'après le règlement CEE n° 2377/90 du Conseil du 27 octobre 2000 (Maghuin et al, 2001).

2.1. La préparation des solutions :

2.1.1. La préparation des solutions pour traiter les échantillons :

- Solution acide trichloracétique 1g/ml :
Dissoudre 50g dans 50 ml d'eau ultra pure.
- Solution aqueuse d'acide oxalique dihydraté 0,01mol / l :
Dissoudre 1,26g dans 1 litre d'eau ultra pure.
- Solution d'acide oxalique dihydraté 0,01mol /l de méthanol :
Dissoudre 1,26g dans 1litre de méthanol.
- Solution d'acide citrique monohydraté 21g/ml :
Dissoudre 21g dans un litre d'eau ultra pure.
- Solution hydrogénophosphate disodique anhydre 28,4mg/ml :
Dissoudre 28,4 g dans un litre d'eau ultra pure.
- Préparation d'une solution tampon Mac Ilvain :
Mélanger un litre de la solution d'acide citrique avec 625ml de la solution d'hydrogénophosphate disodique anhydre puis ajuster le pH à 4.
- Solution tampon Mac Ilvain/ EDTA :
Ajouter 60,5g d'EDTA au 1,625 ml de tampon Mac Ilvain de manière à obtenir une solution contenant 0,1 mol d'EDTA.

2.1.2. La préparation des solutions étalons d'antibiotiques :**2.1.2.1. La préparation de la solution mère de Pénicilline G 100µg/ml :**

Dissoudre 1mg de Pénicilline G dans 10 ml de méthanol pour préparer des solutions étalons filles à des concentrations variées. Les solutions préparées sont :

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 20µg /ml :

Pipeter 0,2 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 15µg /ml :

Pipeter 0,15 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 10µg /ml :

Pipeter 0,1 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

o La solution intermédiaire de Pénicilline G 05µg /ml :

Pipeter 0,05 ml de la solution mère de pénicilline G dans une fiole de 10ml et ajuster le volume avec du méthanol.

2.1.2.2. La préparation de la solution mère d'érythromycine 100µg/ml :

Ajouter 1mg d'érythromycine en poudre à 10 ml de méthanol.

o La solution étalon fille d'érythromycine 20µg /ml

Pipeter 0,2 ml de la solution mère d'érythromycine dans une fiole de 1ml et ajuster le volume avec du méthanol.

2.2. La préparation des échantillons :

Pour la préparation des échantillons, nous avons suivi trois étapes :

2.1.1. L' extraction :

- Placer 5g de muscle haché dans un tube à centrifuger.
- Ajouter 25 ml de Tampon Mac Ilvain/ EDTA et agiter pendant 30 secondes.
- Agiter 15 minutes avec un agitateur rotatif puis centrifuger 10 minutes.
- Récupérer le surnageant.

2.1.2. La déprotéinisation :

- Prendre le surnageant dans un Becher, ajouter 2,5ml d'acide trichloroacétique à 1g /ml.
- Placer un barreau aimanté dans le Becher et déposer celui-ci sur l'agitateur magnétique pendant une minute.
- Verser le contenu du Becher dans un tube pour une centrifugation.
- Récupérer l'extrait.

2.1.3. La purification :

- Conditionner la cartouche bond-élué avec 1ml de méthanol puis 1ml d'eau ultra pure et en dernier avec 1ml de tampon Mac Ilvain / EDTA.
- Boucher le robinet de la cartouche avec du coton pour éviter la sortie de la poudre.
- Placer 25 g de la poudre FLORISIL dans la cartouche et la déposer sur un support.
- Verser l'extrait dans la cartouche et régler le robinet (débit de 1 à 2 gouttes par seconde).
- Laver la cartouche avec 1ml d'eau ultra pure et la sécher à l'aide d'une pompe à vide pendant 5 minutes.
- Eluer lentement la cartouche avec 1ml de la solution à 0,01mol/l d'acide oxalique méthanolique puis 1ml d'eau ultra pure. Récupérer l'éluat
- Transférer 1ml de l'éluat du premier échantillon dans le micro tube.
- Idem pour les autres échantillons.
- Conserver les micro tubes au frais et à l'abri de la lumière.

2.2. L'injection de l'éluât dans HPLC :

L'analyse a été effectuée par un chromatographe liquide à haute performance comprenant un détecteur UV. La séparation est faite sur une colonne Spherob ODS-C18, avec un débit de phase mobile de 0,8ml/min. La phase mobile est composée d'acétonitrile dégazifié (prendre le flacon de 600 ml d'acétonitrile, le placer dans un bac ultrason durant une heure). Le volume d'injection de l'échantillon est de 20µl. L'étalon de la pénicillineG est injecté à une longueur d'onde de 325 nm et l'étalon érythromycine à une longueur d'onde de 287 nm, selon les normes internationales.

L'ordre d'injection est le suivant :

- Le solvant méthanol.
- Pénicilline G étalon à 20µg/ml.
- Rinçage avec le solvant méthanol.
- Les échantillons (faire des rinçages au solvant après chaque échantillon injecté afin d'éviter les contaminations).
- Rinçage avec le solvant méthanol.
- Erythromycine étalon à 20µg/ml.

2.3. La quantification des concentrations de résidus :

2.3.1. La quantification de pénicilline G présente dans les échantillons :

La concentration de la solution étalon choisie est de 20µg/ml. Nous avons injecté 20µl de cette solution et nous avons obtenu un pic dont la surface est égale à **330,25**.

Pour calculer les concentrations de résidus de Pénicilline G présents dans les échantillons, nous avons procédé de la manière suivante :

- Calculer la concentration de la Pénicilline G (**X**) présente dans 20µl de la solution étalon injecté dans HPLC :

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Solution étalon: } 20 \mu\text{g} & \text{-----} > & 1 \text{ ml} \\
 2 \mu\text{g} & \text{-----} > & 100 \mu\text{l} \\
 \mathbf{X} & \text{-----} > & 20 \mu\text{l}
 \end{array}
 \quad
 \boxed{\mathbf{X} = 0,4 \mu\text{g}}$$

- Calculer la concentration (**Y**) de la Pénicilline G présente dans 5g de muscle du premier échantillon **E₁**, à partir de la surface de sa courbe (pic) et de la concentration de Pénicilline G calculé (**X= 0,4µg**) avec la surface de sa courbe .

$$\begin{array}{rcl}
 0,4 \mu\text{g (Péni G étalon)} & \text{-----} > & 330,25 \text{ (surface du pic de Péni G étalon).} \\
 \mathbf{Y} & \text{-----} > & 503,77 \text{ (surface pic du } \mathbf{E_1})
 \end{array}$$

$$\boxed{\mathbf{Y} = 0,601 \mu\text{g} / 5\text{g}}$$

- Calculer la concentration du premier échantillon [**E₁**] dans un kilogramme de muscle :

$$\begin{array}{rcl}
 0,601 \mu\text{g} & \text{-----} > & 5\text{g} \\
 [\mathbf{E_1}] & \text{-----} > & 1000\text{g}
 \end{array}
 \quad
 \boxed{[\mathbf{E_1}] = 122 \mu\text{g} / \text{kg}}$$

Procéder de la même manière pour calculer la concentration des autres échantillons.

2.3.2. La quantification d'érythromycine présente dans les échantillons :

La surface obtenue après l'injection de 20 µl de la solution étalon d'érythromycine (20 µg/ml) est **S = 710,80**.

- Chercher la concentration d'érythromycine dans 20 µl de la solution étalon :

$$\begin{array}{lcl} 20\mu\text{g} & \text{-----}> & 1000\ \mu\text{l} \\ X & \text{-----}& \rightarrow 20\ \mu\text{l} \end{array} \quad \quad \quad \mathbf{X = 0,4\ \mu\text{g}}$$

- Quantifier l'érythromycine dans 5g de l'échantillon₁₅ dont la surface est S₁₅ = 420,3

$$\begin{array}{lcl} 0,4\ \mu\text{g} & \text{-----}> & 710,80. \\ H & \text{-----}& > 420,3 \end{array} \quad \quad \quad \mathbf{H = 0,236\mu\text{g} / 5g}$$

- Quantifier l'érythromycine dans un kilogramme :

$$0,236\mu\text{g} \times 1000\text{g} / 5\text{g} = 47,3\mu\text{g}$$

La concentration d'érythromycine dans E₁₅ = **47,3 µg/Kg**

Chapitre III : Les résultats

1. Les résultats de la méthode microbiologique :

On débute par la lecture des antibiotiques témoins, afin de vérifier la conformité des souches test utilisées et de voir également si notre procédé est concluant lors de l'apparition d'une zone annulaire translucide correspondant à la zone d'inhibition (Tableau XII).

Tableau XII: Les diamètres d'inhibition des antibiotiques témoins

Espèce	pH	Antibiotiques	Diamètre de la zone d'inhibition
Bacillus subtilis	6,0	Pénicilline G	20 mm
	7,2	Sulfadimirazine	18 mm
	8,0	Streptomycine	23 mm
Micrococcus luteus	8,0	Erythromycine	25 mm

Par la suite, on procède à la lecture des boîtes de pétri des échantillons. Sont considérés comme positifs, les échantillons de muscle présentant des zones d'inhibition supérieures ou égales à 2mm (Fabre; 2003) selon les normes internationales. Ceux qui présentent des zones d'inhibitions inférieures à 2mm, sont considérés comme des échantillons négatifs.

Sur les 30 échantillons analysés, deux échantillons seulement (les numéros 10 et 15) ont présenté des zones d'inhibition supérieures à 2mm. Nous avons remarqué que l'échantillon 15 avait des zones d'inhibition sur deux milieux. Les deux échantillons (10 et 15) sont considérés alors comme positifs, soit 6,66% et les 28 autres échantillons, sont considérés comme négatifs, soit 93,33 % (cf. Tableau XIII et figure 13).

Tableau XIII: Nombre d'échantillons positifs aux antibiotiques tests

Nombre total d'échantillons	Nombres d'échantillons positifs aux antibiotiques test			
	Pénicillines pH 6,0	Sulfamides pH 7,2	Streptomycines pH 8,0	Erythromycines pH 8,0
30	02	0	0	1

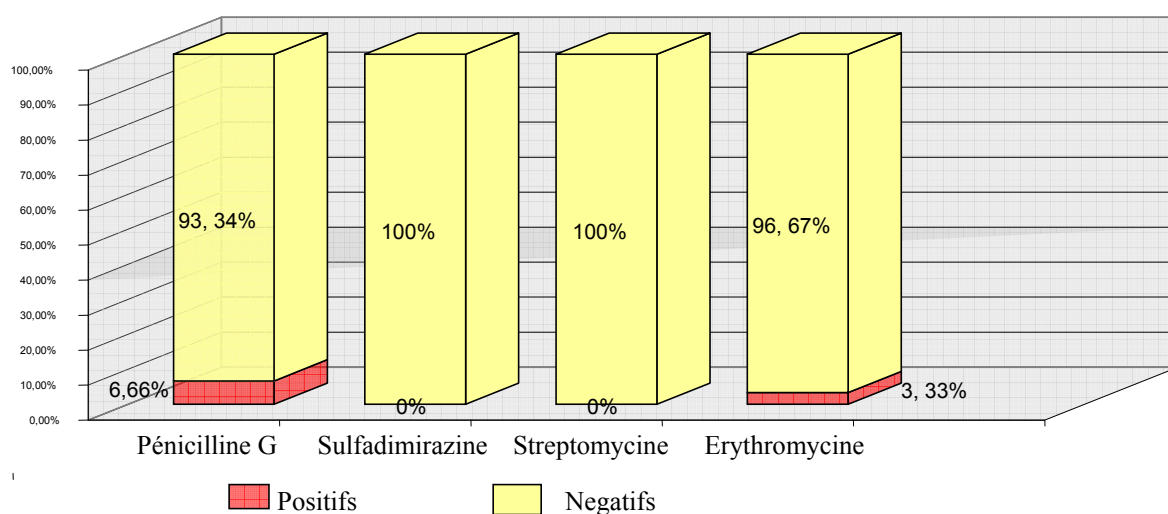


Figure 13: Résultats de la méthode microbiologique

Bacillus subtilis pH 6,0 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, deux (02) seulement sont positifs à la pénicilline G, soit 6,66%. Ces deux échantillons ont présenté des zones annulaires comprises entre 04 et 07mm; ils sont donc considérés comme positifs à la pénicilline G (Tableau XIV).
- Les vingt-huit (28) échantillons restants, soient 93,34% n'ont pas présenté de zones annulaires; ils sont considérés comme négatifs à la pénicilline G (Tableau XV).

Bacillus subtilis pH 7,2 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, aucun échantillon n'a présenté de zone annulaire; ils sont alors considérés comme négatifs à la sulfadimirazine.

Bacillus subtilis pH 8,0 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, aucun n'a encore présenté de zone annulaire; ils sont donc considérés comme négatifs à la streptomycine.

Micrococcus luteus pH 8,0 :

- Sur les trente (30) échantillons analysés, l'échantillon (**E₁₅**) a présenté une zone annulaire de 05mm soit 3,33%. Il est considéré comme positif à l'érythromycine, rappelons que ce même échantillon est positif à la pénicilline (Tableau XIV).
- Les vingt-neuf (29) restants (soit 96,67%) n'ont pas présenté de zones annulaires. Ils sont considérés comme négatifs à l'érythromycine (Tableau XV).

Tableau XIV: Diamètre des zones annulaires des échantillons positifs

Echantillons Positifs	Zone annulaire des échantillons positifs aux antibiotiques test en millimètres					
	Pénicillines pH 6,0		Sulfamides pH 7,2	Streptomycines pH 8,0	Erythromycines pH 8,0	
E 10	06mm	07mm	-	-	-	
E 15	05mm	04mm	-	-	05mm	05mm

Tableau XV: Résultats de la méthode microbiologique

Espèce	pH	Antibiotiques	Pourcentage d'échantillons	
			Positif	Négatif
Bacillus subtilis	6,0	Pénicilline G	6,66%	93,34%
	7,2	Sulfadimirazine	0%	100%
	8,0	Streptomycine	0%	100%
Micrococcus Luteus	8,0	Erythromycine	3,33%	96,67%

2. Les résultats de la méthode chromatographique :

Nous avons recherché les deux antibiotiques détectés avec la méthode microbiologique.

1.2.1. Les résultats de la pénicilline G par HPLC :

1.2.1.1. Le résultat de la pénicilline G étalon 20 μ g/ml :

Pour la pénicilline G étalon, nous avons obtenu, avec la longueur d'onde 325 nm, une courbe de bonne qualité avec un temps de rétention égale à $t_r = 2,46$ et une surface $S = 330$ (Figure 14).

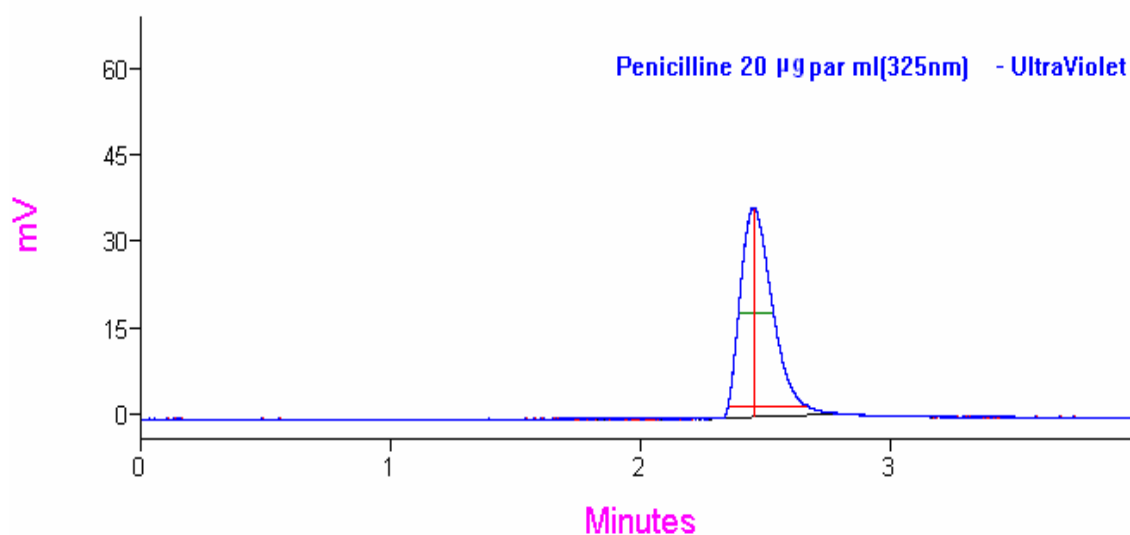


Figure 14: Pic de la pénicilline G étalon 20 μ g/ml

1.2.1.2. Les résultats des échantillons:

Pour les trente échantillons analysés, nous avons obtenu des pics, avec des temps de rétention très proches de celui de la solution étalon de pénicilline G et des surfaces très variables (voir annexe 3). La concentration moyenne des 30 échantillons est égale à 204,85 μ g/Kg (Tableau XVI).

Tableau XVI: Concentrations des échantillons en pénicilline G trouvées par HPLC

Echantillon	Surface	Concentration $\mu\text{g} / \text{kg}$
E ₁	503,77	122
E ₂	938,23	227,28
E ₃	829,83	201,02
E ₄	1275,02	308,90
E ₅	1117,99	270,82
E ₆	951,70	230,54
E ₇	947,56	229,54
E ₈	966,01	234,00
E ₉	947,82	229,60
E ₁₀	419,03	101,50
E ₁₁	627,67	152,05
E ₁₂	773,26	187,31
E ₁₃	663,45	160,71
E ₁₄	850,53	206,00
E ₁₅	936,50	226,86
E ₁₆	939,66	227,26
E ₁₇	1073,53	260,05
E ₁₈	963,47	233,39
E ₁₉	742,93	179,97
E ₂₀	924,46	223,94
E ₂₁	725,71	175,80
E ₂₂	889,52	215,48
E ₂₃	748,42	181,30
E ₂₄	867,61	210,17
E ₂₅	796,56	192,96
E ₂₆	732,49	177,44
E ₂₇	1015,94	246,10
E ₂₈	805,15	195,04
E ₂₉	584,44	141,57
E ₃₀	811,32	196,53
La moyenne des concentrations		204,85$\mu\text{g}/\text{kg}$
Ecart type		43,61

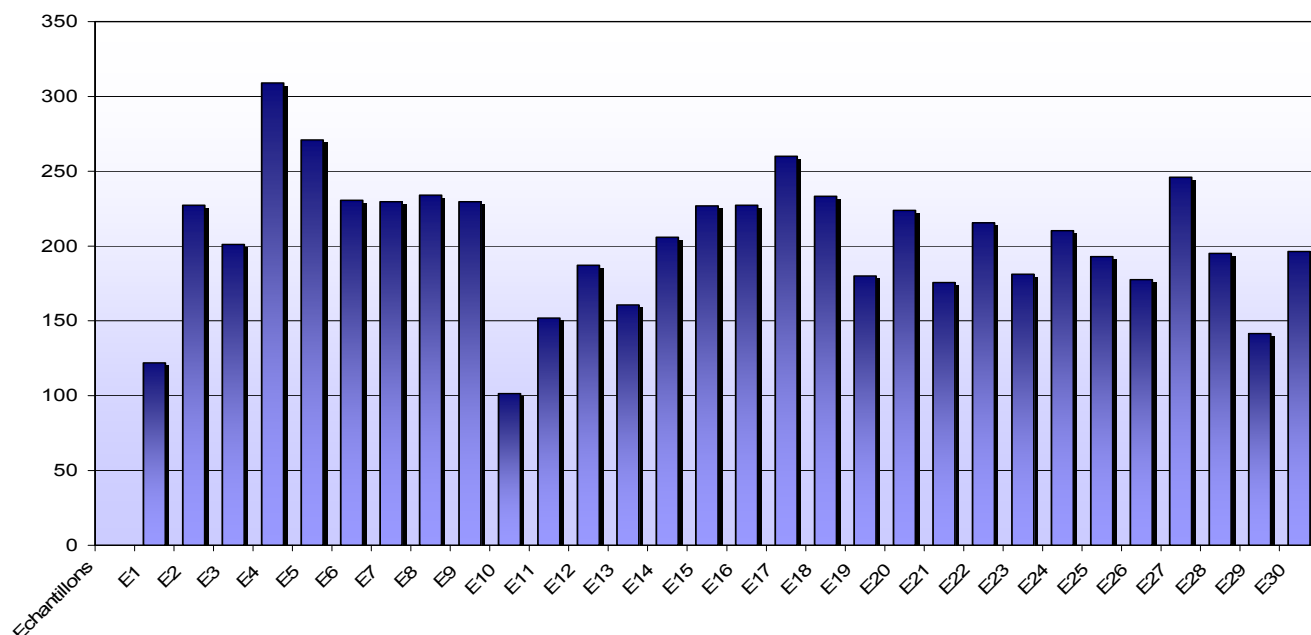


Figure 15: Histogramme des concentrations de pénicilline G détectées

1.2.2. Le résultat d'érythromycine étalon 20 μ g/ml :

Lors de l'injection de la solution étalon d'érythromycine à la longueur d'onde 287nm, nous avons remarqué, que son temps de rétention $t_r = 3,42$ était très proche de celui de la pénicilline G, donc un risque de chevauchement entre les pics des deux antibiotiques (pénicilline G et érythromycine) était possible lors de l'injection de l'éluât d'échantillons (Figure 16).

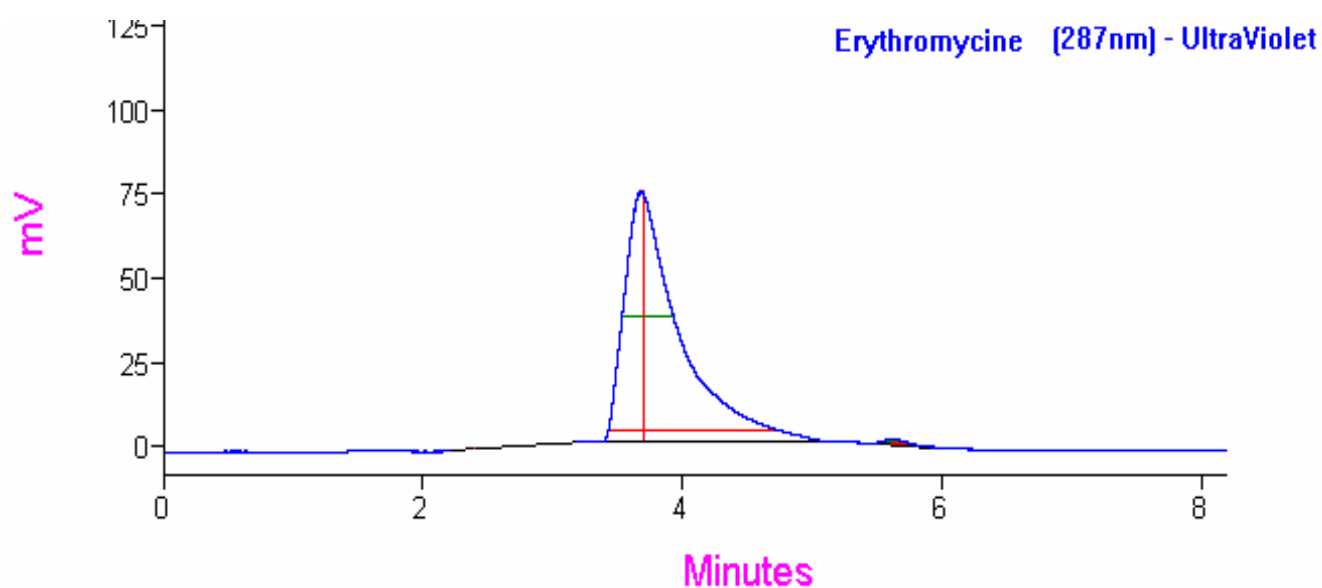


Figure 16: Pic de l'érythromycine étalon 20 μ g/ml

Pour éviter le chevauchement des deux pics, nous avons mélangé les deux solutions étalon d'antibiotiques et injecté 20 μ l de ce mélange dans HPLC.

Après une mise au point, et avec la longueur d'onde 287nm, nous avons obtenu une bonne séparation des deux pics. (Figure 17).

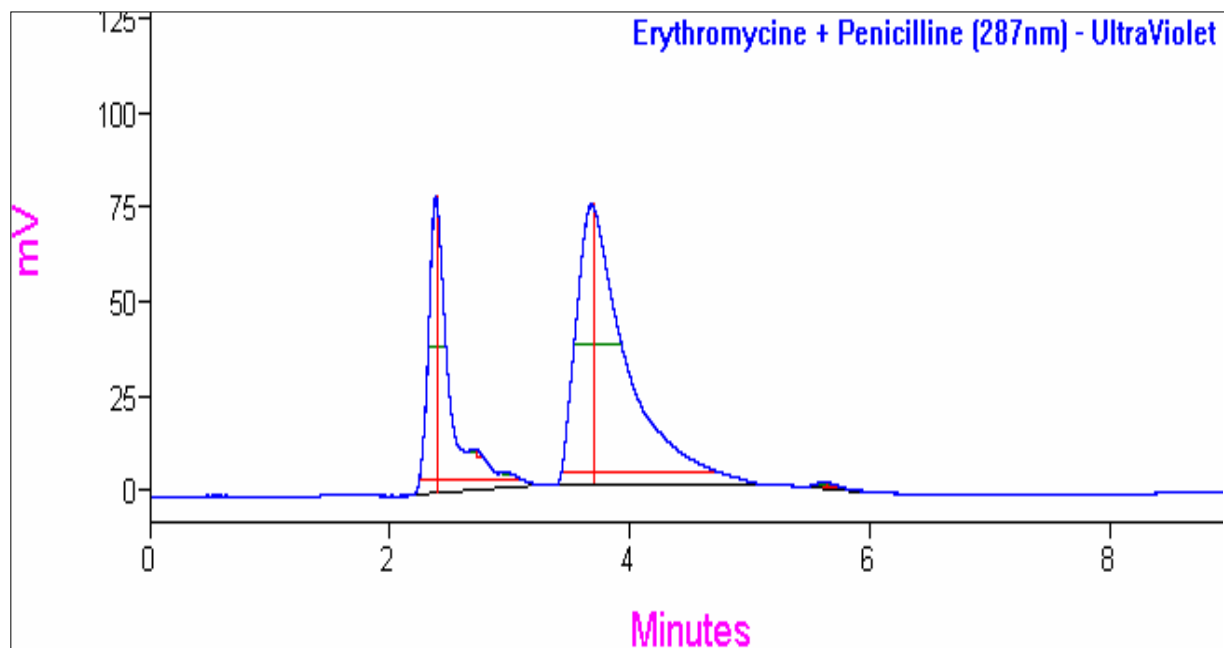


Figure 17: Pics des deux étalons associés (érythromycine et pénicilline G) à 20 μ g/ml

Pour des raisons techniques et économiques, nous avons quantifié les résidus d'érythromycine uniquement sur l'échantillon 15 (E₁₅) (Figure 18).

Nous remarquons que les pics de l'échantillon 15 sont semblables aux pics de la solution étalon contenant les deux antibiotiques. Le premier pic à la grande surface correspond à la pénicilline G et le second à l'érythromycine.

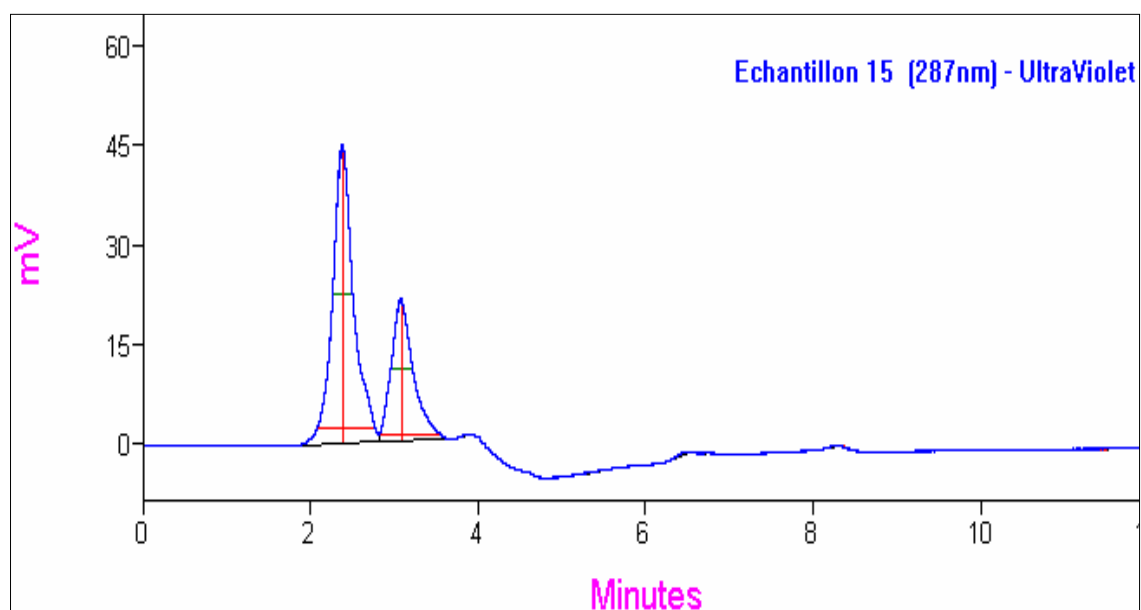


Figure 18: Les pics de pénicilline G et d'érythromycine détectés sur l'échantillon N°₁₅