



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



*Année Universitaire : 2017-2018*

*Filière ingénieurs*

*Industries Agro-Alimentaires*



**Mémoire de projet de fin d'étude**

---

# **Détection des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles**

---

*Réalisé par l'élève-ingénieur:*

***Khadija HALMAOUI***

*Encadré par:*

***- Mme Fadma GHARRABI      LRAR ONSSA MEKNES***

***- Pr. Laila MANNI                      FST FES***

***Présenté le 21 Juin 2018 devant le jury composé de:***

***-Pr. Abdelali TAZI***

***-Pr. Amal HAUDI***

***- Pr. Laila MANNI***

***Stage effectué au : Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches/ONSSA MEKNES***

***(Période de stage : 15 Janvier 2018- 1 Juin 2018)***



**Faculté des Sciences et Techniques - Fès**

**B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES**

**212 (0)5 35 60 29 53 Fax : 212 (0)5 35 60 82 14**

## *Remerciements*

Je tiens à remercier dans un premier temps, toute l'équipe pédagogique de la Faculté des Sciences et Techniques de FES.

J'ai l'énorme plaisir de présenter mes sincères remerciements à la direction de « **Laboratoire Régional d'Analyses et Recherches** » dans la personne de son président directeur **M. ESSALEH** pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage dans un endroit convenable.

Mes chaleureux remerciements vont à l'équipe de **LRAR ONSSA MEKNES** pour leur collaboration et leur contribution à la réussite de mon stage.

Mes sincères remerciements vont aussi au **Pr. Laila MANNI** mon encadrant au sein de la **FST** et **Mme Fadma GHARRABI** mon encadrant au sein de laboratoire **LRAR/ONSSA** responsable d'unité de microbiologie alimentaire pour leur générosité en matière de formation et d'encadrement et l'aide qu'elles m'ont apporté tout au long de mon stage. Sans oublier **M. Omar AMAR** responsable d'unité de bactériologie au sein de la **DPIV** « **Division de ma Pharmacie des Intrants Vétérinaires** » pour ses conseils pédagogiques professionnelles et ainsi qu'à toute l'équipe de laboratoire.

J'adresse mes sincères et chaleureux remerciements au **Dr Réda EDERAR**, Responsable d'unité de biologie moléculaire, **Mme Safae GOUIT** responsable d'unité de phytopathologie aussi **M. Abderrahim EDDAHBY** responsable d'unité de chimie alimentaire, **Dr Réda MEZOUG** médecin vétérinaire au service de l'ONSSA sans oublier **Mme Nadia ADARKAOUI** et **M. EL Bachir ATFANI** pour leurs soutien.

Je tiens à exprimer mon respect et remerciements aux membres du jury **Pr Abdelali TAZI** et **Pr. Amal HAOUDI** qui ont bien voulu donner de leur temps pour corriger ce rapport et assister à la présentation et l'évaluation de ce travail, ainsi qu'à tout le corps professoral de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

Sans oublier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin pendant la période de stage.

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail en signe de respect et d'amour à mes très chers parents qui ont partagé mes joies et mes peines, qui ont été toujours à mes côtés, et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Que Dieu les garde toujours en bonne santé.*

*A mes chères sœurs et mon frère.*

*A tous les membres de ma famille du plus petit au plus grand*

*A tous mes ami(e)s sans exception qu'ils soient proche ou loin.*

*A toute personne qui lira ce mémoire...*

***Khadija HALMAOUI***

*Liste des abréviations*

**AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

**ANSES** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

**ATCC** : American Type Culture Collection

**B.** : Bacillus

**BTS** : Bouillon Tryptone Soja

**CC $\beta$**  : Capacité de détection

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**Cpm** : Coups par minute

**DGA** : Direction Générale de l'Alimentation

**DHS** : dihydrostreptomycine

**DJA** : Dose Journalière Admise

**DPIV** : Division Pharmaceutique des Intrants Vétérinaires

**DSE** : Dose Sans Effet

**E** : Echantillon

**E.** : Escherichia

**EB**: Extraction Buffer

**EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**I** : Intermédiaire

**ISO** : Organisation internationale de normalisation

**J** : jour

**L.** : Listeria

**LC-MS** : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

**LMR** : Limite Maximale de Résidus

**LRAR** : Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches

**LT** : Lot du Travail

**M.** : Micrococcus

**MH** : Mueller Hinton

**MMDH** : Milliards de dirhams

**MSU** : Standard multi-antimicrobienne

**N** : Normalité

**NM** : Norme Marocaine

**O.I.E** : Organisation Mondiale de la Santé Animale

**ONSSA** : Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires

**Ppb** : Partie pour milliard

**R** : Résistante

**Rpm** : Route par minute

**S** : Sensible

**S.** : Staphylococcus

**SE** : Semence d'Essai

**SS** : Suspension de Spores

**TMP** : triméthoprime

**TN** : Témoin Négatif

**TP1** : Témoin Positif de la pénicilline

**TP2** : Témoin Positif de dihydrostreptomycine

**TP3** : Témoin Positif de sulfadimérazine

**TP4** : Témoin Positif d'érythromycine

**TPNC** : Concentré Négatif de Performance Tissulaire

**TSA** : Tryptone Soja Aga

### *Liste des figures*

Figure 1: Organigramme de LRAR ONSSA MEKNES .....	3
Figure 2: Schéma du mode d'action des antibiotiques .....	8
Figure 3: Etapes du mode opératoire de PremiTest .....	21
Figure 4: Plage de couleurs de PremiTest .....	21
Figure 5: Technique d'ensemencement par écouvillonnage.....	23
Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de pénicilline	31
Figure 7: Présentation graphique des résultats du PremiTest .....	34
Figure 8 : Comparaison de la sensibilité des échantillons testés par rapport des souches utilisées.....	37
Figure 9 : Comparaison de la présence des résidus des antibiotiques entre les souches de <i>B. Subtilis</i> et <i>M. luteus</i> .....	41
Figure 10: Pourcentage des échantillons positifs selon les souches de références .....	41
Figure 11: Répartition des résultats selon le nombre des familles d'antibiotiques détectés.....	42

### *Liste des tableaux*

Tableau 1: Valeurs nutritionnelles pour 100g de poulet (ANSES, 2008).....	5
Tableau 2: Grandes familles des antibiotiques (Talbert et <i>al.</i> , 2009) .....	9
Tableau 3: Temps d'attente des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire .....	12
Tableau 4: Différentes méthodes microbiologiques de détection des résidus des antibiotiques (Belmahdi, 2010).....	14
Tableau 5: Souches, antibiotiques et milieux utilisés dans la méthode de diffusion .....	22
Tableau 6: Les antibiotiques standards et le temps d'incubation de chaque souche .....	28
Tableau 7: Absorbances mesurées des étalons et des témoins.....	31
Tableau 8: Détermination de point de contrôle .....	32
Tableau 9: Capacité de détection CC $\beta$ de la pénicilline.....	33
Tableau 10: Spécificité du test Charm II.....	33
Tableau 11: Reproductibilité du test Charm II.....	33
Tableau 12: Résultats d'analyse du PremiTest .....	34
Tableau 13: Seuils de déectabilité des principales familles d'antibiotiques par le PremiTest par rapport aux LMRs dans les viandes de volailles (AFNOR,2006).....	35
Tableau 14: Diamètre des zones d'inhibitions obtenues pour les antibiotiques testés avec les souches de références et normes .....	35
Tableau 15: Diamètre moyen des zones d'inhibitions en mm des échantillons obtenus.....	36
Tableau 16: Zone annulaire moyenne des témoins positifs et négatifs avec les normes .....	38
Tableau 17: Zone d'inhibition moyenne en mm des échantillons analysés.....	40
Tableau 18: Absorbances mesurées et concentration obtenues par extrapolation pour les 9 échantillons analysés .....	43
Tableau 19: Comparaison entre les différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques .....	44

## **Table des matières**

*Dédicace*

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

**Introduction générale** ..... 1

*Présentation de Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches LRAR / ONSSA MEKNES*..... 2

**I. Description de l'ONSSA** ..... 2

**II. Description de LRAR ONSSA MEKNES** ..... 2

1. Section Santé animale ..... 2

2. Section Hygiène alimentaire..... 2

3. Section Qualité- métrologie..... 2

**III. Organigramme de LRAR ONSSA MEKNES**..... 3

### **Partie I: Synthèse bibliographique**

**A : Filière avicole au Maroc** ..... 4

**I. Evolution de l'aviculture au Maroc** ..... 4

**II. Généralités sur les viandes de volailles** ..... 4

1. Définition de la viande ..... 4

2. Définition de la volaille ..... 4

3. Définition de la viande blanche ..... 5

4. Composition et valeur nutritive de la viande de volailles ..... 5

**B : Etude des antibiotiques**..... 6

**I. Généralités sur les antibiotiques**..... 6

1. Historique ..... 6

2. Définition des antibiotiques..... 6

3. Caractéristiques des antibiotiques ..... 7

**II. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire** ..... 8

**III. Classification des antibiotiques**..... 8

**C : Résidus des antibiotiques** ..... 10

**I. Définition**..... 10

**II. Facteurs de persistance**..... 10

**III. Risques présentés par les résidus d'antibiotiques**..... 10

1. Effets sur l'organisme humain..... 10

a. Réactions allergiques..... 10

b.	Risque cancérigènes .....	10
c.	Modification de la flore intestinale humaine.....	11
d.	L'antibiorésistance .....	11
IV.	<i>Prévention des risques de la présence des résidus d'antibiotiques</i> .....	11
1.	Limite Maximale de Résidus (LMR) .....	11
2.	Temps d'attente ou délai avant abattage.....	12
D :	<i>Différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques</i> .....	12
I.	<i>Méthodes de détection microbiologique</i> .....	13
1.	Méthode Alternative (PremiTest).....	13
2.	Méthode de Référence : Méthode des 4 boîtes.....	13
3.	Antibiogramme.....	13
a.	Méthode de dilution.....	13
b.	Méthode de diffusion « antibiogramme standard ».....	13
II.	<i>Méthodes de détection physico-chimique</i> .....	14
1.	Test Charm II.....	15
2.	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	15
3.	Chromatographie liquide couplée à des techniques de spectrométrie de masse (LC-MS).....	15
<b>Partie II : Matériel et Méthodes</b>		
A :	<i>Test Charm II</i> .....	16
I.	<i>Principe</i> .....	16
II.	<i>Mode opératoire</i> .....	16
1.	Contenu du kit et matériaux nécessaires.....	16
2.	Préparation des réactifs.....	16
a.	Standard multi-antimicrobien de MSU-MA.....	16
b.	Réactif de concentré négatif de performance tissulaire (TPNC).....	17
c.	MSU Extraction Buffer (MSU-EB).....	17
d.	M2 Buffer .....	17
3.	Préparation des contrôles.....	17
a.	Contrôle négatif.....	17
b.	Contrôle positif.....	17
c.	Point de contrôle.....	17
4.	Echantillonnage .....	18
5.	Extraction de l'échantillon .....	18

6. Validation du test.....	19
<i>B : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode alternative : PremiTest.....</i>	<i>20</i>
<i>I. Principe.....</i>	<i>20</i>
<i>II. Méthode.....</i>	<i>20</i>
<i>III. Mode opératoire.....</i>	<i>20</i>
<i>IV. Lecture des résultats.....</i>	<i>21</i>
<i>C : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode de diffusion.....</i>	<i>22</i>
<i>I. Principe.....</i>	<i>22</i>
<i>II. Mode opératoire.....</i>	<i>22</i>
1. Etude de la sensibilité des souches de référence aux antibiotiques recherchés.....	22
1. Protocole.....	22
a. Préparation de l'inoculum.....	22
b. Préparation du milieu d'ensemencement.....	23
c. Ensemencement : Technique par écouvillonnage.....	23
d. Traitement des échantillons.....	23
e. Dépôt des échantillons.....	23
f. Lecture des résultats.....	24
<i>D : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode des quatre boites.....</i>	<i>24</i>
<i>I. Principe.....</i>	<i>24</i>
<i>II. Mode opératoire.....</i>	<i>24</i>
1. Préparation des microorganismes sensibles.....	24
a. <i>Bacillus subtilis</i> Réf : ATCC 6633 LT 161006 DPIV RABAT.....	24
b. <i>Micrococcus luteus</i> Réf ATCC 9341 DPIV RABAT.....	25
2. Préparation des solutions témoins des antibiotiques.....	26
a. Solution de triméthoprime TMP : « SIGMA référence T 7883 ».....	26
b. Solution témoin contenant de la pénicilline : « SIGMA référence PENNA ».....	26
c. Solution témoin contenant de la dihydrostreptomycine DHS : « SIGMA D 7253 ».....	26
d. Solution témoin contenant de la sulfadimérazine « SIGMA référence S 6256 ».....	27
e. Solution témoin contenant de l'érythromycine « SIGMA référence E6376 ».....	27
3. Traitement des échantillons.....	27
a. Echantillonnage.....	27
b. Prélèvements et stockage.....	27
c. Traitement des échantillons.....	28
4. Technique de diffusion.....	28

a. <i>Bacillus subtilis</i> à pH 6.....	28
5. Lecture des résultats .....	28
<i>E : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode turbidimétrique.....</i>	<i>29</i>
<i>I. Principe .....</i>	<i>29</i>
<i>II. Mode opératoire.....</i>	<i>29</i>
1. Matériel biologique .....	29
2. Appareillage et réactifs.....	29
3. Méthodes .....	29
a. Technique turbidimétrique .....	29
b. Dosage turbidimétrique .....	30
c. Courbe d'étalonnage .....	30
<b><i>Partie III :Résultats et Discussion</i></b>	
<i>I. Test Charm II.....</i>	<i>32</i>
<i>II. Résultats de PremiTest .....</i>	<i>34</i>
<i>III. Résultats de la méthode de diffusion .....</i>	<i>35</i>
<i>IV. Résultats de la méthode des quatre boites.....</i>	<i>38</i>
<i>V. Résultat de la méthode turbidimétrique .....</i>	<i>43</i>
<b><i>Conclusion .....</i></b>	<b><i>45</i></b>
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

## *Introduction générale*

La production de viande blanche a connu un essor important au Maroc au cours de ces dernières années, ce qui a rendu le prix de ce produit relativement bas et très attractif pour le consommateur. Elle se présente ainsi comme la principale source de protéines d'origine animale pour la population. Dans l'élevage de volailles, les agriculteurs utilisent plusieurs variétés de produits pharmaceutiques et en particulier des antibiotiques. Ils sont utilisés soit en tant que promoteurs de croissance pour augmenter les rendements de production ou en tant que remèdes thérapeutiques pour traiter et prévenir contre les maladies spécifiques.

Les antibiotiques occupent une place de choix. Néanmoins, leur utilisation sans contrôle peut conduire à la formation des résidus dans les produits issus de ces animaux, surtout lorsque les délais d'attente ne sont pas respectés par les utilisateurs.

Les risques potentiels liés à la présence des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale sont de plusieurs ordres : risques cancérigènes (Nitrofuranes), risques allergiques (Pénicillines, Streptomycine), risques toxiques (Chloramphénicol), modification de la flore intestinale (Tétracyclines).

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail réalisé au sein du Laboratoire Régional d'Analyses et Recherches, qui vise la détection des résidus d'antibiotiques dans les viandes de volailles en utilisant différentes méthodes qualitatives et quantitatives.

Pour ce faire, ce présent travail est divisé en trois parties :

Dans la première partie qui concerne la bibliographie, nous rappelons brièvement la progression de la production des viandes blanches au Maroc ainsi l'utilisation des antibiotiques en aviculture et ses effets néfastes sur la santé du consommateur.

La deuxième partie représente le matériel et les méthodes, nous abordons dans cette partie le protocole expérimental des différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques réalisé au sein de la DPIV et LRAR « ONSSA ».

La troisième partie comporte les principaux résultats et discussions.

## ***Présentation de Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches LRAR / ONSSA MEKNES***

### **I. Description de l'ONSSA**

L'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA) est un établissement public doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière créée par la loi n° 25-08 et placé sous la tutelle de l'Etat. Il exerce, pour le compte de l'Etat, les attributions relatives à la protection de la santé du consommateur et à la préservation de la santé des animaux et des végétaux. Il est appelé à appliquer la politique du gouvernement en matière de sécurité sanitaire des végétaux, des animaux et des produits alimentaires depuis les matières premières jusqu'au consommateur final, y compris les aliments pour animaux.

### **II. Description de LRAR ONSSA MEKNES**

Le Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches (LRAR MEKNES) est créé en 2016 sous le patronage de sa majesté. LRAR est un laboratoire rattaché à la direction de l'office national de sécurités sanitaires des produits alimentaires ONSSA.

Elle comprend trois sections :

#### **1. Section Santé animale**

La section Santé Animale, qui se compose de l'unité Diagnostic Bactériologique, de l'unité Parasitologie- Entomologie, de l'unité Diagnostic de la Rage, et de l'unité Sérologie- Immunologie, assure le diagnostic étiologique des maladies animales, d'origine bactérienne, virale ou parasitaire.

#### **2. Section Hygiène alimentaire**

La section Hygiène Alimentaire, qui se compose de l'unité Microbiologie Alimentaire, et de l'unité Chimie-Toxicologie, assure le contrôle de la qualité microbiologique, et chimique des denrées alimentaires. (Autocontrôles et Contrôles officiels).

#### **3. Section Qualité- métrologie**

La section Qualité- Métrologie, qui est chargé de la mise en place du système management qualité selon la norme NM ISO 17025.

### III. Organigramme de LRAR ONSSA MEKNES

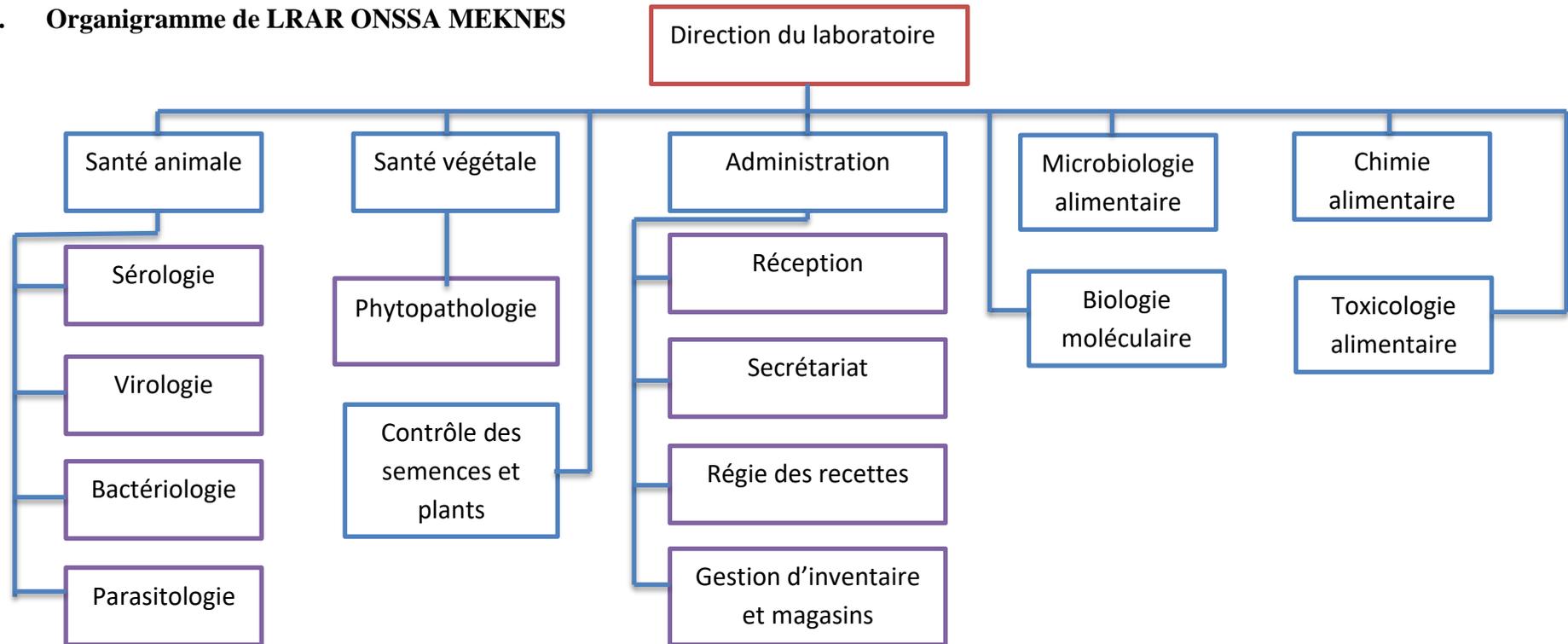


Figure 1: Organigramme de LRAR ONSSA MEKNES

# *Partie I: Synthèse bibliographique*

**A : Filière avicole au Maroc**

**B : Etude des antibiotiques.**

**C : Résidus des antibiotiques.**

**D : Différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques.**

## ***A : Filière avicole au Maroc***

### **I. Evolution de l'aviculture au Maroc**

Le secteur avicole revêt une grande importance socio-économique au Maroc. Il permet de couvrir 100 % des besoins en viandes de volailles, représentant plus de 50 % de la consommation totale toutes viandes confondues, 100 % des besoins en œufs de consommation et 38 % des apports en protéines d'origine animale.

En 2017, 689 500 tonnes de viandes de volailles et 5,5 milliards d'œufs de consommation ont été produits au Maroc, assurant ainsi une consommation moyenne de 17,7 kg de viandes de volailles par habitant et par an et 180 œufs par habitant et par an.

Il faut souligner par ailleurs, que le Maroc, en plus de son autosuffisance, est arrivé à exporter un volume de 13,2 millions d'œufs à couver, 2,4 millions de poussins de type chair et 8 900 tonnes d'aliments composés.

Le chiffre d'affaires du secteur avicole est de 6,75 milliards de dirhams (MMDH). L'aviculture marocaine bénéficie d'investissements cumulés de 3.25 MMDH. En outre, cette filière offre en permanence 21 000 emplois directs et près de 31 000 emplois indirects dans les circuits de commercialisation et de distribution ([www.fisamaroc.org.ma](http://www.fisamaroc.org.ma)).

### **II. Généralités sur les viandes de volailles**

#### **1. Définition de la viande**

La viande, selon l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (O.I.E.) désigne toutes les parties comestibles d'un animal. Le mot animal, dans ce contexte, désigne tout mammifère ou oiseau (O.I.E, 2010). La viande pourrait donc être définie comme l'ensemble des aliments d'animaux constitués par les tissus musculaires, associés à du gras, des nerfs et du sang, ainsi que de la triperie et des abats. Selon l'origine de l'animal, on peut classer les viandes en viandes d'élevage (provenant des bovins, des ovins, des caprins, des porcins, de la volaille, des lapins d'élevage) et la viande de gibier (produit de la chasse en général, ou viandes d'animaux sauvages) (Kantati, 2011).

#### **2. Définition de la volaille**

Le terme « volaille » englobe : les poulets, canards, oies, dindes, pintades...etc. De tous, ce sont les poulets dont l'élevage est le plus répandu. L'aviculture prend une place de choix dans les plans de développement de nombreuses nations tant pour des raisons nutritionnelles et économiques que de goût.

### 3. Définition de la viande blanche

La viande blanche est une protéine animale présentant autant de qualités nutritives que la viande rouge (ovine, bovine). Dans le passé cette protéine était qualifiée de viandes des pauvres.

### 4. Composition et valeur nutritive de la viande de volailles

Les viandes de volailles sont peu caloriques, elles sont relativement pauvres en graisses, une partie importante se situe dans la peau et est donc facile à enlever (Brunel *et al.*, 2006).

La valeur nutritive de la viande peut être résumée dans les quatre points essentiels suivants :

- ✓ La viande est une source d'azote de grande valeur biologique. Cet azote est présent sous forme de protéines. Ces protéines sont composées essentiellement de myosine, myoalbumine et de collagène.
- ✓ Elle est aussi une bonne source de minéraux. Les viandes sont riches en phosphore et représentent la meilleure source alimentaire de fer héminique.
- ✓ La viande une source d'énergie. Son potentiel calorique dépend de sa teneur en matières grasses. La teneur en glucides est négligeable car il n'y a pratiquement plus de glycogène dans la viande au stade de sa commercialisation.
- ✓ Les viandes sont dépourvues de vitamines liposolubles. Elles sont plutôt riches en vitamines du groupe B.

**Tableau 1: Valeurs nutritionnelles pour 100g de poulet (ANSES, 2008)**

Nom des constituants	Unité	Teneur moyenne
Energie	kcal	124
Eau	g	73
Protéines	g	22,2
Glucides	g	0
Sucres	g	0
Fibres alimentaires	g	0
Lipides	g	3,93
AG saturés	g	1,01
AG monoinsaturés	g	1,34
AG polyinsaturés	g	0,85
Cholestérol	mg	71
Sodium	mg	51
Magnésium	mg	26

Phosphore	mg	480
Potassium	mg	287
Calcium	mg	13,7
Manganèse	mg	0,02
Fer total	mg	0,74
Cuivre	mg	0,04
Zinc	mg	0,86
Vitamine D	µg	0
Vitaminique E	mg	0,28
Vitamine C	mg	17
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	0,15
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	0,09
Vitamine B3 ou Niacine	mg	10,7

## ***B : Etude des antibiotiques***

### **I. Généralités sur les antibiotiques**

#### **1. Historique**

En 1928, le médecin britannique sir Alexander Fleming (1881-1955) découvre qu'une moisissure, le *Penicillium notatum*, empêche les cultures de bactéries de proliférer. La substance bactériostatique sécrétée par la moisissure prend le nom de pénicilline et devient disponible comme médicament dans les années 40 : c'est le premier antibiotique. Depuis, beaucoup d'autres substances actives contre de nombreuses bactéries ont été découvertes. Actuellement, les chercheurs s'efforcent de découvrir de nouvelles molécules actives sur les bactéries les plus résistantes, de diminuer la toxicité de ces médicaments et de simplifier leur mode d'administration.

#### **2. Définition des antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des bactéries du sol et certains champignons, elles peuvent aussi être obtenues par la synthèse chimique totale ou partielle qui, à faible concentration, agissent sur d'autres bactéries sans être toxiques sur l'homme ; Chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries ; ils peuvent tuer les bactéries (effet bactéricide) ou ralentir leur croissance (effet bactériostatique) (Stor et Meslin, 1998).

### 3. Caractéristiques des antibiotiques

Chaque antibiotique possède plusieurs caractéristiques :

**Le spectre d'activité** est la liste des bactéries sur lesquelles l'antibiotique est actif. Il est dit large lorsque l'antibiotique agit à la fois sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et étroit lorsqu'il n'est actif que sur l'un de ces deux types de bactéries. Les autres bactéries sont dites « résistantes » (résistance naturelle ou acquise).

**Le caractère bactériostatique ou bactéricide** de l'antibiotique correspond à l'arrêt de la multiplication ou à la destruction des bactéries.

**Le devenir dans l'organisme**, selon les voies d'administration possibles (locale, orale, injectable), est fonction de la répartition du produit dans les tissus, de son pouvoir de pénétration dans les cellules, de son organe d'élimination (rein ou foie).

**La tolérance** dépend de la toxicité du produit et de la fréquence des allergies à ce médicament.

Le choix d'un antibiotique dépend également de la nature de l'infection (siège, gravité) et de l'état de volaille. Il est parfois nécessaire d'associer plusieurs produits, par exemple en cas d'infection grave

### 4. Mode d'action

L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactérie d'autre part ; pour résumer ces dernières, on peut dire que pour être actif, un antibiotique doit :

- ✓ Pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne ;
- ✓ Ne pas être inactivé ;
- ✓ Etre capable de se lier à sa cible.

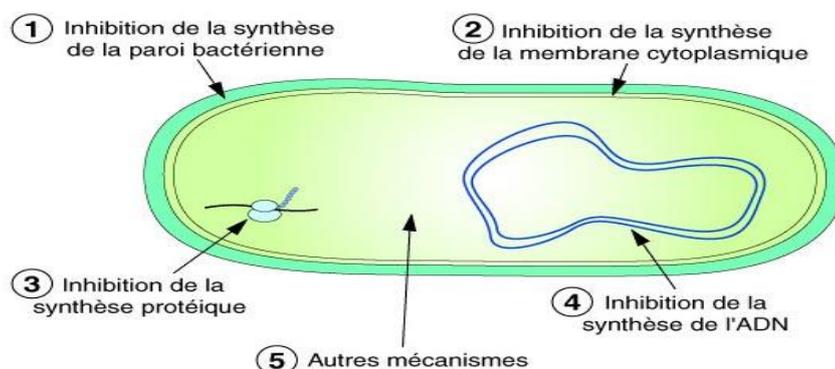
Ce sont là les conditions nécessaires à l'activité antibactérienne ; l'antibiotique exercera son action qui pourra être de deux types :

- ✓ Bactériostatique s'il n'y a qu'une simple inhibition de la croissance bactérienne ;
- ✓ Bactéricide s'il y a mort de la bactérie.

Le mécanisme d'action des antibiotiques n'est pas toujours parfaitement élucidé mais on distingue cinq grands modes d'action : (figure 2).

- ✓ Action sur la synthèse du peptidoglycane ;
- ✓ Action sur la membrane cytoplasmique ;
- ✓ Action sur l'ADN ;
- ✓ Action sur la synthèse des protéines ;

✓ Action par inhibition compétitive.



**Figure 2: Schéma du mode d'action des antibiotiques**

## II. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire

Ces médicaments sont utilisés soit en tant que traitement curatif appliqué de manière individuelle ou collective à des animaux atteints d'affections microbiennes, soit en tant que traitement préventif pour éviter l'apparition de certaines pathologies ou encore, dans certains cas extrêmes, pour pallier des insuffisances en matière d'hygiène dans l'élevage (Sanders, 2005).

L'utilisation des anti-infectieux en tant que médicaments est récente dans l'histoire contemporaine. Elle est considérée comme l'un des progrès majeurs de la médecine, car elle a permis de réduire de manière spectaculaire la morbidité et la mortalité due aux nombreuses maladies infectieuses d'étiologie bactérienne (Sanders et al., 2011).

Après leur administration aux animaux, ces traitements donnent lieu à la présence des résidus dans les tissus et aliments produits par ces animaux. La présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale liée au non-respect des conditions d'utilisation (posologie et temps d'attente) ou à des erreurs dans la conduite de l'élevage peut avoir de graves conséquences sur la santé des consommateurs (Fagbamila et al., 2010).

## III. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés en fonction de leurs origines, nature chimique, mode d'action. Parmi celles-ci, les  $\beta$ -lactamines, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les sulfamides et les fluoroquinolones sont les plus importants (Kümmerer, 2009). Le tableau 2 montre les grandes familles d'antibiotiques.

**Tableau 2: Grandes familles des antibiotiques (Talbert et al., 2009)**

<b>BÊTA-LACTAMINES</b>	Pénicillines (Pénames)	Groupe G	Activité : bactéricide Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse de la paroi des bactéries en phase de croissance.
		Groupe M (groupe de la méticilline) Antistaphylococciques	
		Groupe A (groupe de l'ampicilline) (aminopénicillines)	
		Carboxypénicillines -Urédopénicillines	
		Amidinopénicillines	
	Carbapénèmes (pénèmes)	Imipènem- Ertapènem -Méropènem	
	Céphalosporines (céphèmes)	1 <sup>er</sup> génération -2 <sup>ème</sup> génération-3 <sup>ème</sup> génération.	
		Céphalosporine à spectre étendu	
Monobactames	Aztréonam		
Inhibiteurs irréversibles des bêtalactamases (en association)			
Acide clavulanique – Sulbactame- Tazobactam			
<b>AMINOSIDES</b> (aminoglycosides)		Activité : bactéricide Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique.	
<b>PHENICOLES</b>		Activité : bactériostatique. Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique.	
<b>CYCLINES</b>	Tétracyclines	Activité : bactériostatique.	
	Glycylcyclines	Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique.	
<b>MACROLIDES</b>	Macrolides	Activité : bactériostatique.	
	Macrolides apparentés (linocosanidesetsysnergistines)	Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique.	
	Macrolides associés		
<b>SULLFAMIDES</b>		Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse de l'acide folique.	
<b>QUINOLONONES</b>	Quinolones urinaires- Fluoroquinolones systémiques	Activité : bactéricide	
	Quinolones dites antipneumococques	Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse de l'ADN bactérien.	
<b>ANTIBIOTIQUES DIVERS</b>	Glycopeptides -- lipopeptides cycliques- Acide fusidique.	Activité bactéricide.	
	Acide fusidique- Fosfomycine	Mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique ; inhibition enzymatique du métabolisme bactérien ; inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.	

## ***C : Résidus des antibiotiques***

### **I. Définition**

Les résidus d'antibiotiques sont définis comme étant tous principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré.

### **II. Facteurs de persistance**

La persistance des résidus d'antibiotiques varie selon plusieurs facteurs :

- ✓ Facteurs liés au médicament lui-même : la forme physique et chimique du médicament intervient dans son absorption et sa distribution dans l'organisme.
- ✓ Facteurs liés au mode et à la voie d'administration : les antibiotiques sont administrés aux animaux par différentes voies, c'est-à-dire par injections, oralement dans l'eau ou la nourriture, ou par voie cutanée.
- ✓ Facteurs liés à l'animal correspondent essentiellement à son espèce mais également à l'âge et à l'état pathologique.

### **III. Risques présentés par les résidus d'antibiotiques**

Les résidus d'antibiotiques présents dans les viandes ont pour origine un traitement médicamenteux (antibiotique) reçu par l'animal. Leur présence dans les muscles et/ou certains tissus de l'animal dépend des caractéristiques pharmacocinétiques du médicament administré ainsi que de la voie d'administration (Stoltz, 2008). Ils peuvent être à l'origine de certains effets.

#### **1. Effets sur l'organisme humain**

##### **a. Réactions allergiques**

Les résidus d'antibiotiques sont parfois évoqués comme cause dans les réactions allergiques observées chez l'homme suite à la consommation de denrées d'origine animale (Stoltz, 2008). Certains antibiotiques peuvent être responsables d'accidents de type allergique à la dose thérapeutique : principalement les  $\beta$ -lactamines, les tétracyclines, les sulfamides, les quinolones et les macrolides.

##### **b. Risque cancérigènes**

Certains antibiotiques ont des propriétés cancérigènes connues. En effet, les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir un effet cancérigène sur le long terme, suite à une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. Certains antibiotiques ou composés utilisés comme antibiotiques sont alors interdits d'utilisation chez les animaux de reproduction ; c'est le cas des nitrofuranes, des nitroimidazoles utilisés chez les poissons (Stoltz, 2008).

### **c. Modification de la flore intestinale humaine**

Certains résidus d'antibiotiques ayant encore une activité contre les bactéries, sont potentiellement capables de modifier la microflore intestinale de l'homme ; la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires peut ainsi entraîner un risque d'affaiblissement des barrières microbiologiques et de colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes ou opportunistes (Châtaigner, 2004).

### **d. L'antibiorésistance**

L'utilisation des antibiotiques en thérapeutique humaine ou vétérinaire s'accompagne de l'apparition de résistances à ces mêmes antibiotiques chez les bactéries ce qui constitue un problème très préoccupant du fait des répercussions directes sur les possibilités thérapeutiques. Pour de nombreux auteurs, les résidus d'antibiotiques entraînent une sélection des souches bactériennes résistantes dans le tractus gastro-intestinal des consommateurs mais jamais une induction de la résistance, sauf rares exceptions, comme pour l'érythromycine. La pression de sélection favorise l'augmentation du nombre de micro-organismes résistants, que cette résistance soit naturelle ou acquise, et que ces microorganismes soient pathogènes ou non (Van-Den Bogaor, 2001).

## **IV. Prévention des risques de la présence des résidus d'antibiotiques**

Deux notions sont à respecter : la notion de la limite maximale des résidus (LMR), et la notion du temps d'attente.

### **1. Limite Maximale de Résidus (LMR)**

La LMR correspond à la concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires.

Cette limite se base sur des études scientifiques permettant de définir le type et la quantité de résidus considérés comme ne présentant pas de risques d'ordre toxicologique pour la santé humaine (Doses Sans Effets ou DSE), et les possibilités d'élimination par l'organisme humain (Doses éliminables ou Doses Journalière Admises notées DJA) (Laurentie et Sanders, 2002).

Cependant, bien que très importants, les LMRs ne sont pas directement utilisables sur le terrain par les professionnels (vétérinaires et éleveurs). On a donc défini un temps au bout duquel la quantité de résidus présents dans les tissus d'un animal, par suite des processus d'élimination physiologiques, devient inférieure à la LMR après la dernière administration du médicament. Ce temps est appelé « temps d'attente » ou « délai avant abattage ».

## 2. Temps d'attente ou délai avant abattage

Le temps d'attente est défini comme étant la durée pendant laquelle l'animal traité ne doit pas être abattu ou les denrées alimentaires produites par l'animal traité (lait, œufs) ne peuvent être commercialisées en vue de la consommation humaine. Le tableau 3 montre le délai avant abatages des antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire (Kantati, 2011).

**Tableau 3: Temps d'attente des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire**

<i>Antibiotiques</i>	<i>Le temps d'attente</i>
Colistine injectable	21j
Amoxicilline poudre ou soluble	1j
Eaurofloxacine soluble	7-13j
Phosphomycine soluble phosphomycine +5% de tylosine poudre	7j
Triméthoprime sulfamide soluble	12j
Florfénécole seul ou associé à l'érythromycine	5-7j
Oxytétracycline poudre	7j
Oxytétracycline forme injectable	51j
Tylosine	3j
Colistine	7j
Tylmicosyne	12j poulet 15j dinde
Pénicilline et Erythromycine	21j

### *D : Différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques.*

La présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées pose donc un véritable problème de santé. D'où la nécessité d'instaurer des plans de surveillance et de contrôle des denrées alimentaires d'origine animale (Kantati, 2011)

Deux types de tests sont utilisés pour rechercher les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale :

- ✓ Des tests microbiologiques qui utilisent le principe de la croissance bactérienne, ce sont des méthodes bactériennes encore appelées méthodes d'inhibition.
- ✓ Des tests qui utilisent des méthodes physico-chimiques, tel que la chromatographie en couche mince, la chromatographie en phase liquide ou la chromatographie en phase gazeuse, des techniques enzymatiques ou des techniques immunologiques (Stoltz, 2008).

## **I. Méthodes de détection microbiologique**

Ces méthodes ont pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence des résidus de substances à activité antibiotique sans déterminer leur identité (**Pavlov et al., 2008**).

### **1. Méthode Alternative (PremiTest)**

Elle permet de détecter les substances antimicrobiennes présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les poissons et les œufs. C'est un test à large spectre, qui permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande en moins de 4 heures et sur du jus de viande (**Eloit, 2004**).

### **2. Méthode de Référence : Méthode des 4 boîtes**

C'est la méthode officielle française de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande. Elle a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies (**Gaudin et al., 2006**). Cette méthode sera développée dans notre partie expérimentale.

### **3. Antibiogramme**

Il s'agit d'une technique de mise en évidence de la sensibilité d'un germe déterminé, isolé par culture vis-à-vis de certains antibiotiques. Il est pratiqué selon deux méthodes : (**pharmacopée européenne 6.0**)

#### **a. Méthode de dilution**

Elle permet d'établir la concentration minimale inhibitrice (CMI) en mettant le germe en présence de différentes concentrations d'antibiotique en milieu liquide « bouillon de culture ».

#### **b. Méthode de diffusion « antibiogramme standard »**

Elle s'effectue en milieu gélosé, l'antibiotique disposé sur disque de papier, diffuse en réalisant un gradient de concentration circulaire.

La détermination de diamètre de la zone d'inhibition permet de déterminer la CMI. Elle permet de classer la sensibilité du germe vis-à-vis de chaque antibiotique.

**Tableau 4: Différentes méthodes microbiologiques de détection des résidus des antibiotiques (Belmahdi, 2010).**

Nom de la méthode	Microorganismes utilisés	pH du milieu de culture	Antibiotique détectés
PremiTest	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Se trouve sous forme de tubes contenant des spores de <i>B.stearothermophilus</i> dans une gélose.	Tous les antibiotiques
Méthode Star	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>	pH 8 pH 8 pH 8 pH 6 pH 7,4	Aminosides $\beta$ -lactamines+macrolides Tétracyclines Quinolones Sulfamides+ $\beta$ -lactamines
Méthode de référence (méthode des 4 boites)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus luteus</i>	pH 6 pH 8 pH 7,4 pH 8	$\beta$ -lactamines + tétracycline sulfamides aminosides $\beta$ -lactamines + macrolides
Test rénal	<i>Bacillus subtilis</i>	Sous forme de kit	Tous les antibiotiques
Test stop (Swab test on premises)	<i>Bacillus subtilis</i>	pH 7,9	Aminosides
Test des 2 boites (Two-plate test)	<i>Bacillus subtilis</i>	pH 6 pH 8	$\beta$ -lactamines+tétracyclines, sulfamides

## II. Méthodes de détection physico-chimique

Ces techniques de recherche des antibiotiques se sont considérablement développées ces dernières années.

Les méthodes de détection physico-chimique ou bien les tests de confirmation, ce sont des tests qui viennent confirmer les résultats des méthodes biologiques. Ils permettent d'identifier formellement la molécule de résidu présente dans la denrée et sa teneur exacte. Ils sont donc à la fois qualitatifs et quantitatifs, plus précis, et permettent de détecter les résidus même en concentration très faible, jusqu'à deux fois moins que les LMR (Délepine et al., 2002). Parmi ces méthodes :

### 1. Test Charm II

Selon le référentiel (Charm Science, 2016) Le test Charm II est un essai rapide de radiorécepteur pour la détection des résidus des différentes familles des antibiotiques et peut être utilisé sur trois produits alimentaires : les viandes, les œufs et le lait.

### 2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Elle est utilisée dans la détection de multiples résidus d'antibiotiques tel que les résidus de sulphonamide, de  $\beta$ -lactamine, de macrolide, de tétracycline, et ce, dans des types d'échantillons très variés tels que le lait ou les tissus (Kennedy *et al.*, 1998).

### 3. Chromatographie liquide couplée à des techniques de spectrométrie de masse (LC-MS)

Le développement important de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) dans le domaine de l'environnement a fait de cette technique un outil puissant pour la détermination précise des résidus d'antibiotiques dans le sol (Diaz-Cruz et Barcelo, 2007). Cette méthode est utilisée pour l'analyse des aliments tels que : le lait, les poissons, et les tissus musculaires (Becker *et al.*, 2004).

# Partie II : Matériel et Méthodes

**A : Test Charm II**

**B: Détection des résidus des antibiotiques par la méthode alternative : PremiTest**

**C : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode de diffusion**

**D : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode des quatre boites**

**E : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode turbidimétrique**

## A : Test Charm II

Ce travail a été effectué au service bactériologique au sein de la division pharmaceutique des intrants vétérinaires à RABAT. Il a pour objectif la contribution à la validation de la méthode de détection des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles selon le référentiel Charm Science INC OM-237-009 Août 2016.

### I. Principe

Le test Charm II  $\beta$ -lactamine utilise un réactif de liaison avec des sites récepteurs spécifiques qui lient tous les médicaments bêta-lactamines. Le liant est ajouté à un extrait d'échantillon avec une quantité de pénicilline marquée au [ $^3\text{H}$ ] (traceur). Tous les médicaments bêta-lactamines de l'échantillon sont en concurrence pour les sites de liaison avec ce traceur.

La quantité de traceur qui se lie aux sites récepteurs est mesurée et comparée à un point de contrôle préalablement déterminé. Le point de contrôle est le point de coupure entre un échantillon négatif ou positif. Plus la quantité de traceur mesurée est grande, plus la concentration de bêta-lactamines dans l'échantillon est faible. Plus la quantité de traceur mesurée est petite, plus la concentration de bêta-lactamines dans l'échantillon est élevée.

### II. Mode opératoire

#### 1. Contenu du kit et matériaux nécessaires

Fourni avec les kits	Jetables	Equipements
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réactif de comprimé de PMSU</li> <li>• Réactif de Standard multi-antimicrobien de concentré de MSU-MA</li> <li>• Réactif de Concentré négatif de performance tissulaire TPNC</li> <li>• Tampon d'extraction MSU</li> <li>• Tampon M2</li> <li>• Bandes de pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipettes</li> <li>• Tubes à essai en verre</li> <li>• Tubes à centrifuger en plastique</li> <li>• Liquide de scintillation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipettes</li> <li>• Incubateur de 80 °C.</li> <li>• Mélangeur Vortex</li> <li>• Incubateur de Charm II</li> <li>• Centrifugeuse</li> <li>• Analyseur « appareil » Charm II</li> <li>• Robot culinaire</li> </ul>

#### 2. Préparation des réactifs

##### a. Standard multi-antimicrobien de MSU-MA

- Reconstituer le réactif MSU-MA avec 10,0 mL d'eau distillée. Bien agiter. Puis mettre au réfrigérateur ou dans la glace pendant 15 minutes. Mélanger avant utilisation. La concentration finale de MSU-MA est 1000 ppb de pénicilline G.

**b. Réactif de concentré négatif de performance tissulaire (TPNC).**

- Reconstituer le TPNC avec 10,0 mL d'eau distillée. Bien agiter. Laisser le TPNC reposer au réfrigérateur ou dans de la glace pendant 15 minutes. Mélanger avant utilisation. Le TPNC reconstitué peut être conservé au réfrigérateur pendant 48 heures maximum.

**c. MSU Extraction Buffer (MSU-EB)**

- Reconstituer le MSU-EB avec 1000 mL d'eau distillée dans un récipient propre. Bien mélanger. Laisser MSU-EB atteindre la température ambiante avant utilisation. MSU-EB reconstitué peut être réfrigéré jusqu'à 2 mois. Ne pas congeler.

**d. M2 Buffer**

- Reconstituer avec 50,0 mL d'eau distillée. Bien mélanger. Le tampon M2 reconstitué peut être réfrigéré jusqu'à 2 mois. Ne pas congeler.

**3. Préparation des contrôles****a. Contrôle négatif**

1. Pour préparer le contrôle négatif, diluer 2,0 mL de concentré négatif de performance tissulaire (TPNC) avec 6,0 mL de tampon d'extraction MSU (MSU-EB). Bien mélanger.
2. Utiliser 2,0 mL de contrôle négatif à l'étape 3 de la méthode de dosage du bêta-lactame Charm II - Procédure de dosage.

**b. Contrôle positif**

1. Ajouter 0,3 mL du réactif de standard multi-antimicrobienne de MSU-MA à 5,7 mL de TPNC dans un tube à centrifuger. Bien mélanger.
2. Dans un nouveau tube à centrifuger, diluer encore 2,0 mL du mélange TPNC / MSU-MA avec 6,0 mL MSU-EB. Bien mélanger. Utilisez ceci comme contrôle positif.
3. Utiliser 2,0 mL de contrôle positif à l'étape 3 du test du bêta-lactame Charm II - Procédure de dosage.

**c. Point de contrôle**

Le point de contrôle est un nombre de compte par minute entre un négatif et un positif. Le point de contrôle pour les tissus est calculé à partir des données obtenues en utilisant le contrôle négatif.

1. Diluer 4,0 mL de TPNC avec 12,0 mL de MSU-EB à température ambiante pour obtenir le contrôle négatif.
2. Réaliser 6 répétitions du contrôle négatif et déterminez la moyenne du contrôle négatif.

3. Soustraire 30% de la moyenne pour calculer le point de contrôle.

#### 4. Echantillonnage

Pour la validation de cette méthode, on a utilisé juste deux échantillons de viande de volaille.

Le premier échantillon, c'est une viande dopées par la pénicilline avec une concentration de la LMR (50 ppb / mL), à partir de cette échantillon nous avons réalisé les tests de capacité de détection de l'antibiotique CC $\beta$  et le test de reproductibilité avec changement de deux paramètres (le temps et l'opérateur).

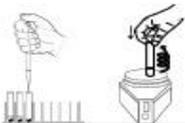
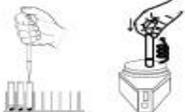
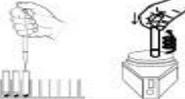
Le deuxième échantillon est un poulet qui ne contient pas des traces de pénicilline et cet échantillon utilisé pour le test de spécificité.

#### 5. Extraction de l'échantillon

Les essais sont effectués à des températures ambiantes qui peuvent être comprises entre 4 et 35°C. On utilise dans ce test du muscle frais ou congelé.

1. Dans un tube de centrifugation, mettre 30 mL de réactif de MSU-EB et 10 g de viande.
2. Ajouter 0,5 mL de MSU-MA.
3. Homogénéiser l'échantillon dans un robot culinaire pendant 30 à 60 secondes. Nettoyez minutieusement le robot culinaire après chaque échantillon pour éviter toute contamination croisée.
4. Placer le tube dans un incubateur à  $80 \pm 2$  ° C pendant 30 minutes puis dans un bain d'eau glacée pendant 10 minutes.
5. Centrifuger les tubes pendant 10 minutes à 33000 rpm.
6. Récupérer la phase supérieure et vérifiez que le pH de l'échantillon est d'environ 7,5. Si le pH est inférieur à 7,5, ajouter 300  $\mu$ l de tampon M2. Si le pH est supérieur à 7,5, ajouter 300  $\mu$ l de HCl 0,1 M.

### III- Procédure de dosage : Test Charm II du bêta-lactame dans les tissus

<b>Etape 1</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter le comprimé vert fourni par le kit dans un tube à essai vide.</li> </ul>
<b>Etape 2</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter 300 µL d'eau.</li> <li>• Mélangez 10 secondes pour dissoudre la tablette.</li> </ul>
<b>Etape 3</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 2,0 mL d'extrait ou de contrôle.</li> <li>• Mélangez immédiatement pendant 10 secondes.</li> </ul>
<b>Etape 4</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Incuber à <math>55 \pm 2</math> ° C pendant 2 minutes.</li> </ul>
<b>Etape 5</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter le comprimé jaune fourni par le kit.</li> <li>• Mélangez immédiatement pendant 10 secondes.</li> </ul>
<b>Etape 6</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Incuber à <math>55 \pm 2</math> ° C pendant 2 minutes.</li> </ul>
<b>Etape 7</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Centrifuger pendant 3 minutes à 30000 rpm</li> </ul>
<b>Etape 8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminer le surnageant.</li> </ul>
<b>Etape 9</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 300 µL d'eau.</li> <li>• Mélangez soigneusement pour dissoudre le culot.</li> </ul>
<b>Etape 10</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter 3,0 mL de liquide de scintillation.</li> <li>• Agiter jusqu'à ce que le mélange ait un aspect uniforme et trouble.</li> </ul>
<b>Etape 11</b> 	<p>Mettre le tube dans l'analyseur pendant 60 secondes. Lire cpm (coups par minute) sur le canal [<math>^3\text{H}</math>].</p>

#### IV. Validation du test

La validation de la méthode de détection des résidus des antibiotiques nécessite l'utilisation des tests statistiques tels que :

- ✓ La capacité de détection
- ✓ La spécificité
- ✓ La reproductibilité

Selon (ANSES, 2014), Pour la validation, chaque échantillon doit être répété 20 fois.

**La répétabilité** c'est la fidélité dans les conditions de répétabilité, ces conditions de réalisation de l'analyse sont :

- ✓ Même opérateur
- ✓ Même laboratoire
- ✓ Même matériel
- ✓ Même méthode
- ✓ Même échantillon
- ✓ Pendant un intervalle de temps

**Capacité de détection** : la capacité de détection est la concentration à laquelle la méthode peut détecter des concentrations à la limite autorisée.

**Spécificité** : est définie comme l'accord négatif qui signifie qu'un échantillon réellement négatif est détecté négatif par cette méthode.

**Reproductibilité** : c'est la fidélité dans les conditions de reproductibilité, ces conditions sont :

- ✓ Opérateur différent
- ✓ Délais variables
- ✓ Même méthodes
- ✓ Même échantillon

**La fidélité** est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions bien établies, et comporte deux aspects : la répétabilité et la reproductibilité.

## ***B : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode alternative : PremiTest***

### **I. Principe**

PremiTest est basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus*, bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques. Des spores standardisées sont incluses dans la gélose additionnée des nutriments sélectionnés (AFNOR, 2011).

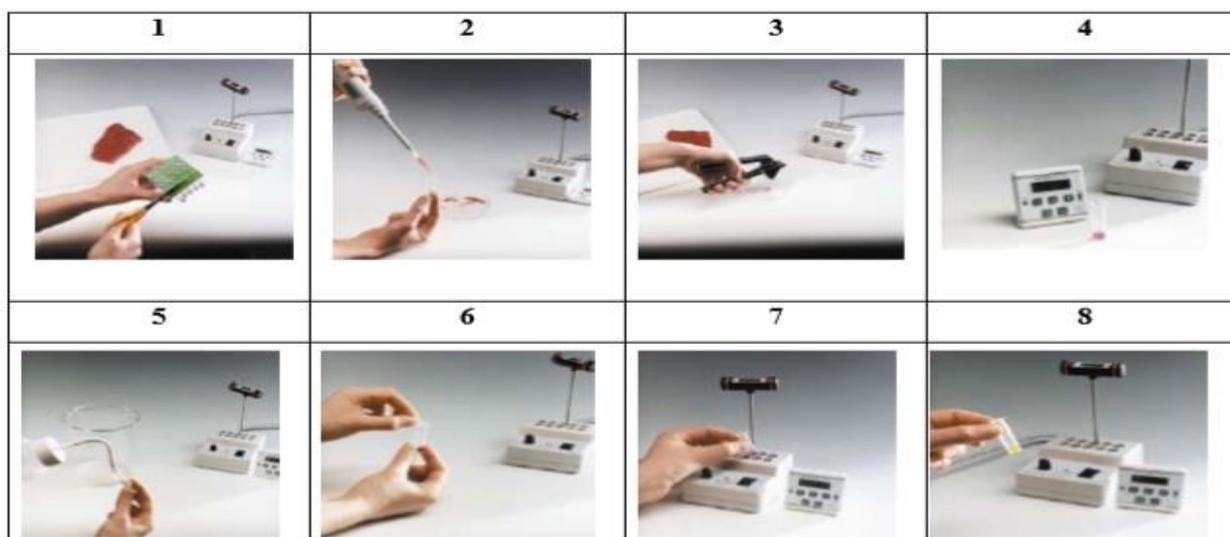
### **II. Méthode**

Le jus de viande est déposé dans des tubes contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacillus stearothermophilus*. Après 20 min de diffusion puis élimination du jus, le tube est incubé environ trois heures à 64°C afin de visualiser le changement de couleur.

### **III. Mode opératoire**

Dans cette méthode nous avons réalisé le test avec 30 échantillons de viande de type poulet de chair, ces viandes sont prélevé par un médecin vétérinaire de l'ONSSA Meknès au sein de la région de Meknès.

- 1-Couper 30 ampoules nécessaires pour les 30 échantillons à tester.
- 2- Prélever environ 5 g de viande maigre et utiliser une presse à viande pour extraire environ 250 µl du jus.
- 3-Déposer progressivement le jus de viande sur la gélose contenue dans l'ampoule.
- 4-Laissez pré-diffuser à température ambiante (15-25°C ) pendant 20 min.
- 5-Eliminer l'excès du jus en lavant la gélose deux fois avec l'eau distillée stérile et sécher avec précaution.
- 6-Fermez l'ampoule de test avec son emballage pour éviter l'évaporation.
- 7-Mettre les ampoules dans l'incubateur à une température de 64°C pendant 3 heures.
- 8-Retirer les ampoules dès qu'un changement de couleur du contrôle négatif a lieu.



**Figure 3: Etapes du mode opératoire de PremiTest**

#### IV. Lecture des résultats

La lecture des résultats repose sur le changement de couleur visualisé à l'œil nu (figure 4) :



**Figure 4: Plage de couleurs de PremiTest**

La lecture des résultats se fait uniquement la partie basse des ampoules (2/3 du fond). La coloration jaune indique l'absence des résidus d'antibiotique au niveau de l'échantillon à tester par contre la couleur violette atteste de la présence de ces substances.

## C : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode de diffusion

### I. Principe

Cette méthode repose sur l'étude de la sensibilité des souches de référence aux antibiotiques recherchés. Cinq souches de références ont été utilisées : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonelle*, *E.coli* et *Bacillus Subtilis*.

### II. Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode microbiologique de diffusion en gélose de l'EUCAST (version 4 Juin 2014 ; EUropran Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) qui se déroule en deux étapes :

#### 1. Etude de la sensibilité des souches de référence aux antibiotiques recherchés

Nous avons utilisés 5 souches de références : *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella spp* et *B. Subtilis*. Nous avons choisi 5 antibiotiques, les plus fréquemment utilisés en élevages de poulet à savoir : l'ampicilline, triméthoprime, Erythromycine, Tétracyclines et pénicilline (tableau 5).

**Tableau 5: Souches, antibiotiques et milieux utilisés dans la méthode de diffusion**

Souches	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogène</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. Subtilis</i>
Concentration de la souche (UFC/mL)	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>
Antibiotique standard	Ampicilline	Triméthoprime	Erythromycine	Tétracycline	Pénicilline
Concentration d'antibiotique	10µg	25µg	15µg	30µg	10µg
Milieu de culture	Mueller Hinton	Mueller Hinton + 10% du sang	Mueller Hinton	Mueller Hinton	Mueller Hinton
Température d'incubation	37°C	37°C	37°C	37°C	30°C

#### 1. Protocole

##### a. Préparation de l'inoculum

Prélever stérilement une à plusieurs colonies de même aspect et mettre en suspension dans 5 mL d'eau physiologique alors que pour *Listeria*, on utilise uniquement 2 ml d'eau physiologique. Un trouble identique à celui de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland doit être obtenu.

### b. Préparation du milieu d'ensemencement

Pour *L. monocytogenes*, utiliser le milieu Mueller Hinton (annexe 2.3) additionné de 10 % de sang de mouton. Ajouter le sang dans le milieu une fois ramené à une température de 42-45°C.

Couler les boîtes avec 10 mL du milieu sur une surface plane de façon à obtenir une épaisseur homogène de la gélose de  $4,0 \pm 0,5$  mm.

Eviter l'apparition de gouttes d'eau sur la surface de la gélose. Laisser les boîtes ouvertes mais faire attention à ce qu'elles ne soient pas desséchées. Les boîtes doivent être mises à température ambiante avant inoculation.

### c. Ensemencement : Technique par écouvillonnage

L'inoculum doit être employé de façon optimale dans un délai de 15 minutes sans jamais dépasser une heure.

Etaler la suspension bactérienne grâce à un écouvillon sur toute la surface en ensemençant dans trois directions (figure 5 ; 3 passages à orientation décalée de 60° pour la boîte et l'écouvillon).

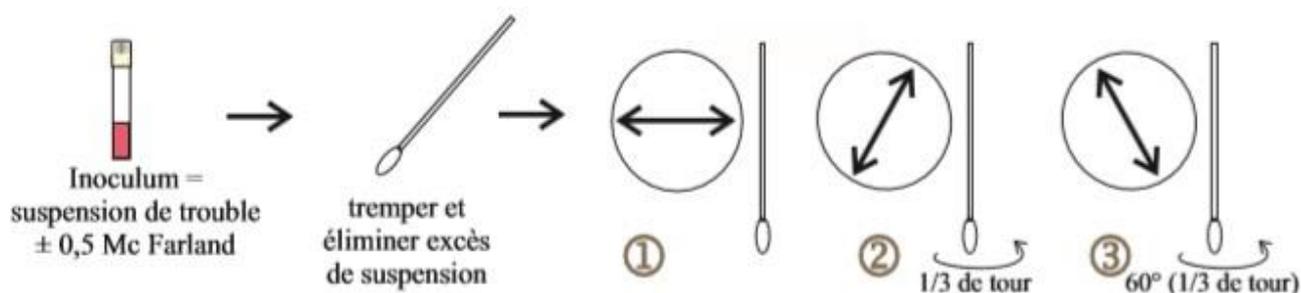


Figure 5: Technique d'ensemencement par écouvillonnage

### d. Traitement des échantillons

Dans cette technique, 20 échantillons de viande de poulet ont été utilisés (les prélèvements sont réalisés par un médecin vétérinaire de l'ONSSA). 2 g de chaque échantillon est broyé dans un flacon stérile avec 5 mL d'eau distillée stérile. Mélanger pendant 3 minutes, puis imbiber deux disques avec 10  $\mu$ L de chaque échantillon et mettre dans la boîte contenant le milieu MH.

### e. Dépôt des échantillons

Déposez au centre de la boîte le disque d'antibiotique ciblé à la surface du milieu puis six disques de 7 mm de diamètre correspondant aux trois échantillons à analyser (E1, E2 et E3).

Incuber les boîtes dans l'étuve pendant 24 heures.

## f. Lecture des résultats

Pour chaque antibiotique, mesurer les diamètres correspondant aux zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques et des échantillons.

Lire les zones au dos des géloses MH sur fond noir éclairé avec une lumière réfléchie.

Lire les zones des géloses MH-S (milieu contenu le sang) directement face à la boîte couvercle retiré, éclairée avec une lumière réfléchie.

## ***D : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode des quatre boîtes***

L'objectif de ce travail est la validation de la méthode de détection des résidus des antibiotiques par la méthode des quatre boîtes selon le référence AFSSA LMV/90/01 version 7/ Décembre 2011.

La présente méthode a pour objectif, à l'aide de micro-organismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sensible (les  $\beta$ -lactamines et les tétracyclines, les sulfamides, les aminosides, et les  $\beta$ -lactamines et les macrolides).

## I. Principe

La détection des résidus des antibiotiques nécessite l'application d'une technique de diffusion en gélose qui comporte :

- ✓ L'ensemencement par un microorganisme sensible aux substances à activité antibiotique, d'un milieu nutritif solide coulé en boîte de Pétri.
- ✓ Le dépôt à la surface du milieuensemencé, d'une rondelle de muscle congelé, suivi d'une incubation à la température optimale de développement du microorganisme test.

Les substances à activité antibiotique éventuellement présentes inhibent la croissance du microorganisme test : il en résulte la formation d'une zone d'inhibition autour de l'échantillon.

Cette méthode requiert l'utilisation des deux espèces suivantes : *B. subtilis* cultivé à deux pH différents (6 et 8) et *Micrococcus luteus* cultivé également à deux pH différents (7,4 et 8).

## II. Mode opératoire

### 1. Préparation des microorganismes sensibles

#### a. *Bacillus subtilis* Réf : ATCC 6633 LT 161006 DPIV RABAT.

##### *a.1. Préparation de la suspension de spores « SS »*

A partir d'un lot de semence long conservation fourni par la DPIV « Division Pharmaceutique des Intrants Vétérinaires » à Rabat, effectuer trois repiquages successifs sur pente dans le milieu

TSA (Tryptone Soja Agar, annexe 2.2). En parallèle ensemencer en stries une boîte de TSA pour isolement et confirmation de l'identification. Incubation est réalisée pendant 18h à 30°C.

A partir du troisième repiquage et à l'aide d'une dizaine de billes de verre et de 2 mL d'eau physiologique, on récolte la culture sous forme d'une suspension.

Dans une boîte de roux, répartir cette suspension à la surface du milieu de sporulation. (Annexe 2.2). Incuber à 30°C pendant 7 jours.

Récolter dans un tube stérile les spores obtenues avec les billes de verre et 25 mL d'eau physiologique.

Incuber le tube contenant la suspension de spores à 70°C pendant 30 min.

Centrifuger cette suspension de spores 15 min à 4400 rpm. Eliminer le surnageant, répéter le lavage deux fois.

Reprendre le culot avec environ 50 mL d'eau physiologique.

Répartir 1,5 mL de SS dans des eppendorfs stériles, cette suspension de spores aliquotée est conservée à 4°C pendant une année.

#### Numération des suspensions de spores :

- Au hasard, prendre 3 eppendorfs pour déterminer la concentration de lot de suspension de spores (carte de contrôle de *B. Subtilis* en annexe 1).
- Réaliser des dilutions décimales dans de l'eau physiologique jusqu'à  $10^{-10}$ , ensemencer 1 mL de chaque dilution en profondeur avec 15 mL de milieu TSA. Incuber à 37°C pendant 18 heures.

#### **a.2.Préparation des boîtes de Pétri**

Ensemencer le milieu test-agar à pH 6 (référence 10663, annexe 2.1) et le milieu test-agar à pH 8 (référence 10664, annexe 2.1) maintenus en surfusion, avec la suspension de spores préalablement diluée de façon à obtenir une concentration de  $5.10^4$  spores/mL.

Répartir le milieu ensemencé dans des boîtes de Pétri à raison de 5 mL par boîte. Laisser refroidir le milieu sur une surface froide et horizontale.

#### **b. *Micrococcus luteus* Réf ATCC 9341 DPIV RABAT**

##### **b.1.Préparation du lot de semence d'essai « SE »**

A partir d'un lot de semences long conservation fourni par la DPIV, ensemencer en stries une pente de milieu TSA. En parallèle ensemencer en stries une boîte de TSA pour isolement et confirmation d'identification. Incuber à 37°C pendant 18 heures. Effectuer de la même façon deux autres repiquages, Stocker les troisièmes pentes au réfrigérateur pendant un mois.

### ***b.2. Préparation de l'inoculum pour les essais***

La veille de l'essai, et à partir de la pente de SE, ensemencer une pente de TSA. Incuber à 37°C pendant 18h.

Le jour de l'essai, à l'aide de quelques billes de verre et de 2 mL d'eau physiologique, mettre la culture en suspension en respectant l'intégrité de la surface de la gélose.

Prélever 95 µl de la suspension et la disposer dans un tube contenant 4 mL d'eau physiologique, puis agiter quelques secondes.

Ajuster l'absorbance de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm en diluant éventuellement avec de l'eau physiologique de façon à obtenir une valeur de densité optique entre 0.40 et 0.45 correspondant respectivement, à une concentration de 1 à 3 10<sup>8</sup> germes/mL.

### ***b.3. Préparation des boîtes de Pétri***

Ensemencer le milieu test-agar à pH 7,4 (référence 10664, annexe 2.1) et le milieu testagar à pH 8 (référence 10664, annexe 2.1) maintenus en surfusion, avec la suspension de germes préalablement diluée de façon à obtenir une concentration d'environ 1 à 3.10<sup>5</sup> germes/mL.

Répartir le milieu ensemencé dans des boîtes de Pétri à raison de 5 mL par boîte. Laisser refroidir le milieu sur une surface froide et horizontale.

## **2. Préparation des solutions témoins des antibiotiques**

### **a. Solution de triméthoprime TMP : « SIGMA référence T 7883 »**

Dissoudre une quantité de 50 mg de TMP correspondant à 50 000 µg de matière active dans 5 mL d'acide acétique à 5% et ajuster à 500 mL avec de l'eau distillé.

La concentration de cette solution est de 100 µg/mL. Elle est conservée au réfrigérateur pendant 14 jours au maximum.

### **b. Solution témoin contenant de la pénicilline : « SIGMA référence PENNA »**

Dissoudre une quantité de 30 mg de pénicilline G sodique correspondant à 50 000 U.I dans 25 mL de méthanol et ajuster à 50 mL avec de l'eau distillé. La concentration de cette solution est de 1000 µg/mL. Cette solution est conservée à -18°C pendant 7 mois.

Préparer une dilution au 1/5000 de la solution mère en effectuant deux dilutions successives l'une au 1/100, l'autre au 1/50. La concentration finale est de 0.2 µg de pénicilline par mL.

### **c. Solution témoin contenant de la dihydrostreptomycine DHS : « SIGMA D 7253 »**

Dissoudre une quantité de 81,77 mg de dihydrostreptomycine sesquisulfate correspondant à 50 000 µg de matière active dans 25 mL de méthanol et ajuster à 50 mL avec de l'eau distillé.

La concentration de cette solution est de 1000 µg de pénicilline par mL. Elle est conservée à -18°C pendant 6 mois. La concentration de cette solution est de 1000 µg/mL.

Préparer une dilution au 1/200 de la solution mère dans l'eau. La concentration finale est de 5 µg/mL de DHS active.

**d. Solution témoin contenant de la sulfadimérazine « SIGMA référence S 6256 »**

Dissoudre une quantité de 50 mg de sulfadimérazine correspondant à 50 000 µg de matière active dans 50 mL de méthanol. Elle est conservée à -18°C pendant 1 an.

La concentration de cette solution est de 1000µg/mL. Préparer une dilution au 1/250 de la solution mère dans l'eau en effectuant deux dilutions successives l'une au 1/10, l'autre au 1/25.

La concentration de la solution finale est de 5 µg/mL de sulfadimérazine active.

**e. Solution témoin contenant de l'érythromycine « SIGMA référence E6376 »**

Dissoudre une quantité de 54 mg d'érythromycine correspondant à 50 000 µg de matière active dans 3 mL de méthanol et ajuster à 50 mL avec de l'eau dans une fiole jaugée.

La concentration de cette solution est de 1000 µg/mL. Elle est conservée au réfrigérateur et peut être utilisée pendant 14 jours au maximum.

Préparer une dilution au 1/4000 de la solution mère dans l'eau en effectuant deux dilutions successives l'une au 1/200, l'autre au 1/20. La concentration de la solution finale est de 0,25 µg/mL d'érythromycine active.

### **3. Traitement des échantillons**

#### **a. Echantillonnage**

20 échantillons de viande blanche de type poulet ont été prélevés par un médecin vétérinaire de l'ONSSA dans la région de Meknès.

4 échantillons (TP1, TP2, TP3 et TP4) de viande blanche considérés comme témoin positif sont dopés par les quatre familles d'antibiotiques pour la validation de la méthode au niveau du laboratoire. Les antibiotiques utilisés dans cette méthode sont la pénicilline, la dihydrostreptomycine, la sulfadimérazine et l'érythromycine.

Un échantillon (TN) considéré comme témoin négatif ne subit aucun traitement par les antibiotiques.

#### **b. Prélèvements et stockage**

Le prélèvement s'est effectué juste après l'abattage, on a découpé à l'aide d'un couteau et une pince stérile 50 g de la viande à analyser.

Chaque échantillon est mis dans un sachet stérile, fermé et numéroté puis conservé au congélateur à une température de  $-18^{\circ}\text{C}$ .

### c. Traitement des échantillons

Mettre l'échantillon congelé à température ambiante pendant quelques minutes.

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

Découper à l'aide d'un bistouri huit rondelles de viande de 2 mm d'épaisseur. Puis placer deux rondelles en positions diamétralement opposées sur chacune des quatre boîtes d'essai en utilisant des pinces.

## 4. Technique de diffusion

### a. *Bacillus subtilis* à pH 6

Déposer au centre de la boîte du milieu test agar un disque de papier filtre. Déposer sur le disque 10  $\mu\text{L}$  de la solution témoin contenant l'antibiotique.

**Tableau 6: Les antibiotiques standards et le temps d'incubation de chaque souche**

	<i>B. Subtilis</i>		<i>M. luteus</i>	
<b>pH</b>	6	8	7,4	8
<b>antibiotiques standard</b>	pénicilline	DHS	sulfadimérazine	érythromycine
<b>temps et température d'incubation</b>	30°C/18h	30°C/18h	37°C/24h	37°C/24h

## 5. Lecture des résultats

Selon Afssa (2011), les deux souches bactériennes de *B. Subtilis* et *M. luteus* permettent la détection de nombreuses familles d'antibiotiques à savoir :

- ✓ *B. Subtilis* à pH 6 : Cette souche permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines ou des tétracyclines.
- ✓ *B. Subtilis* à pH 8 : Cette souche permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des aminosides.
- ✓ *M. luteus* à pH 7.4 : Cette souche permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des sulfamides et des  $\beta$ -lactamines.
- ✓ *M. luteus* à pH 8 : Cette souche permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines et des macrolides.

## ***E : Détection des résidus des antibiotiques par la méthode turbidimétrique***

### **I. Principe**

C'est un test quantitatif, son principe est d'ensemencer un milieu approprié avec une suspension du microorganisme, choisi à cause de leur sensibilité à l'antibiotique à examiner de façon à obtenir une diminution importante de la culture microbienne dans les conditions du titrage. (**Pharmacopée européenne, 2001**). Le principe de cette méthode est que la densité optique d'une suspension est proportionnelle à la masse des particules en suspension. On mesure l'adsorption lumineuse de la suspension et par comparaison à une gamme de référence on déduit la concentration de biomasse.

### **II. Mode opératoire**

#### **1. Matériel biologique**

L'échantillon correspondant au témoin positif, est un poulet qui a reçu l'antibiotique « pénicilline » par injection. L'échantillon qui n'a reçu aucun traitement d'antibiotiques correspond au témoin négatif. Pour la détection des résidus d'antibiotiques, 9 parmi les 20 échantillons traité par la méthode de diffusion sont poulets choisis aléatoirement Pour l'analyse et sont respectivement : E1, E15, E12, E6, E11, E18, E19, E20, E16.

#### **2. Appareillage et réactifs**

- ✓ Spectrophotomètre.
- ✓ Acétonitrile
- ✓ Iso-propanol
- ✓ Acide chlorhydrique 1N et 0.01N
- ✓ Chlorure de méthylène
- ✓ Ether de pétrole
- ✓ Formaldéhyde
- ✓ Pénicilline (antibiotique standard)

#### **3. Méthodes**

##### **a. Technique turbidimétrique**

Elle consiste à incuber des tubes calibrés contenant à la fois le milieu de culture inoculé avec une bactérie sensible et les solutions d'un antibiotique. Après la période d'incubation, l'effet de l'antibiotique sur la croissance bactérienne est mesuré par le changement de l'absorbance mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

**Extraction des prélèvements de viande des témoins positif et négatif :**

Un morceau de viande de 2,5 g est prélevé du muscle et déposée dans un flacon stérile, pour être broyée dans un mortier puis additionnée de 7,5 mL d'eau distillé.

Ajouter 6,5  $\mu$ L d'iso-propanol et laisser reposer 5 min puis agiter le mélange pendant encore 5 min.

Prélever 5 mL du mélange et additionner 0,625 mL du HCl (1N) et 20 mL d'acétonitrile.

Laisser reposer 10 min et filtrer sous vide.

Ajouter 20 mL de chlorure de méthylène et 20 mL d'éther de pétrole puis secouer le mélange vigoureusement et laisser reposer 10 min.

Récupérer la phase inférieure et ajuster le volume avec 20% d'HCl (0,01N).

**b. Dosage turbidimétrique**

Prélever 1 mL de chaque extrait obtenu et ajouter 9 mL de milieu inoculé (milieu BTS annexe 2.4). Homogénéiser, puis incubé les tubes dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

Après incubation, arrêtez la croissance des micro-organismes par addition de 0,5 mL de formaldéhyde. La lecture de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

**c. Courbe d'étalonnage**

Préparer une gamme d'étalons aux concentrations finales de 0,1 à 0,8  $\mu$ g/mL à partir d'une solution mère à 1000  $\mu$ g/mL obtenue par dissolution de 30 mg de pénicilline dans 25 mL de méthanol et ajuster à 50 mL avec l'eau distillée. 1 mL de chaque solution de la gamme étalon est traité de la même façon que les échantillons pour le dosage turbidimétrique.

Le tableau 7 montre les résultats de l'absorbance des témoins positifs et négatifs ainsi que les étalons qui nous a permettent de tracer la courbe d'étalonnage (figure 6).

Tableau 7: Absorbances mesurées des étalons et des témoins

Témoin et étalon	Concentration $\mu\text{g/mL}$	Absorbance
Témoin négatif	0	0,082
Etalon 1	0,1	0,128
Etalon 2	0,2	0,195
Etalon 3	0,4	0,225
Etalon 4	0,7	0,263
Etalon 5	0,8	0,289
Témoin positif	1	0,364

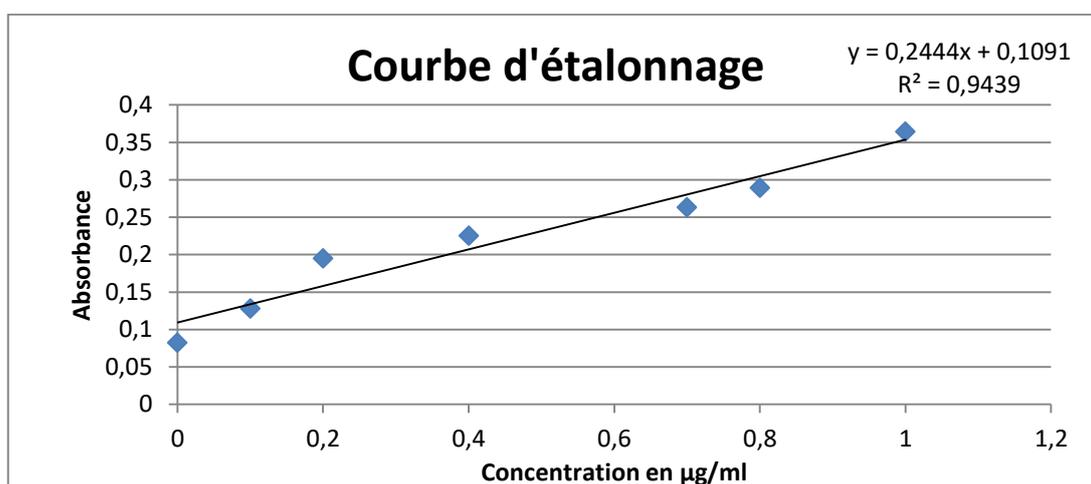


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de pénicilline

# **Partie III :**

## **Résultats et Discussion**

Dans ce travail nous avons appliqué cinq méthodes différentes pour la détection des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles.

### I. Test Charm II

Le test Charm II est un test très rapide qui permet la détection des résidus des antibiotiques par famille.

La validation de la méthode de détection des résidus des antibiotiques nécessite l'utilisation des tests statistiques tels que :

- ✓ La capacité de détection
- ✓ La spécificité
- ✓ La reproductibilité

La répétition du contrôle négatif six fois permet de déterminer le point de contrôle. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau 8: Détermination de point de contrôle**

Test	Contrôle négatif	point de contrôle = -30% de la moyenne
1	1812	<b>1277</b>
2	1784	
3	1892	
4	1913	
5	1796	
6	1747	
<b>Somme</b>	10944	
<b>Moyenne</b>	1824	

La validation de la méthode de détection des résidus des antibiotiques dans les viandes par ce test permet de donner un point de contrôle de l'ordre de 1277 cpm (coups par minute).

Le tableau 9 présente les résultats de capacité de détection de la pénicilline. Pour le même échantillon répété 20 fois

L'analyse des résultats montre que les 20 répétitions donnent des résultats inférieurs au point de contrôle donc l'échantillon contient des traces d'antibiotiques de pénicilline supérieure à la LMR.

**Tableau 9: Capacité de détection CC $\beta$  de la pénicilline**

Echantillon	cpm	Echantillon	cpm	Echantillon	Cpm	Echantillon	cpm
<b>1</b>	851	<b>6</b>	785	<b>11</b>	832	<b>16</b>	1238
<b>2</b>	792	<b>7</b>	1174	<b>12</b>	845	<b>17</b>	952
<b>3</b>	1265	<b>8</b>	835	<b>13</b>	1070	<b>18</b>	841
<b>4</b>	948	<b>9</b>	981	<b>14</b>	932	<b>19</b>	1249
<b>5</b>	1078	<b>10</b>	1142	<b>15</b>	923	<b>20</b>	759

Le tableau 10 résume les résultats de la spécificité de test Charm II pour le même échantillon (échantillon ne contient pas des traces des antibiotiques) répété 20 fois.

**Tableau 10: Spécificité du test Charm II**

Echantillon	cpm	Echantillon	cpm	Echantillon	cpm	Echantillon	cpm
<b>1</b>	1935	<b>6</b>	1572	<b>11</b>	2687	<b>16</b>	4016
<b>2</b>	1710	<b>7</b>	3470	<b>12</b>	3618	<b>17</b>	2541
<b>3</b>	2458	<b>8</b>	2631	<b>13</b>	3512	<b>18</b>	2365
<b>4</b>	2175	<b>9</b>	2379	<b>14</b>	1982	<b>19</b>	1754
<b>5</b>	2554	<b>10</b>	2501	<b>15</b>	2457	<b>20</b>	2549

La répétabilité 20 fois de l'échantillon donne des résultats supérieurs au point de contrôle (1277). Donc l'échantillon traité ne contient pas des résidus des antibiotiques ou bien ne contient pas des traces des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines.

Le tableau 11 représente la reproductibilité de ce test avec les conditions suivantes : changement de l'opérateur et le temps avec le même échantillon traité dans l'analyse de CC $\beta$ , les résultats sont inférieures au point de contrôle donc ce test permet de détecter les résidus de la famille des  $\beta$ -lactamines.

**Tableau 11: Reproductibilité du test Charm II**

Echantillon	cpm	Echantillon	cpm	Echantillon	cpm	Echantillon	cpm
<b>1</b>	844	<b>6</b>	921	<b>11</b>	1095	<b>16</b>	854
<b>2</b>	810	<b>7</b>	1035	<b>12</b>	942	<b>17</b>	1125
<b>3</b>	1092	<b>8</b>	1187	<b>13</b>	874	<b>18</b>	1217
<b>4</b>	985	<b>9</b>	816	<b>14</b>	1265	<b>19</b>	1178
<b>5</b>	975	<b>10</b>	1223	<b>15</b>	952	<b>20</b>	982

Pour le même échantillon traité, la répétition 20 fois a donné des valeurs inférieures au point de contrôle donc on peut conclure qu'il y a présence des résidus de pénicilline.

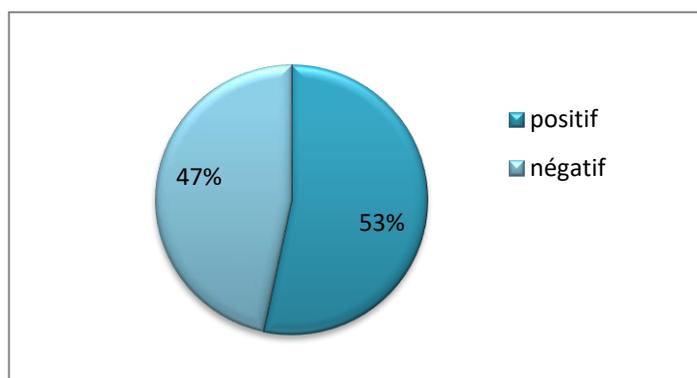
## II. Résultats de PremiTest

Le deuxième test utilisé pour la détection des résidus des antibiotiques est le PremiTest. Les résultats sont résumés dans le tableau 12 et la figure 7.

**Tableau 12: Résultats d'analyse du PremiTest**

E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20
+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30
+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

*E : Echantillon/- : Résultat négatif/+ : Résultat positif*



**Figure 7: Présentation graphique des résultats du PremiTest**

Dans 47% des échantillons, le changement de couleur du violet au jaune sur les deux tiers inférieurs de l'ampoule, indique l'absence d'une substance inhibitrice. Ainsi, 53% des échantillons contiendraient des résidus d'antibiotiques. En considérant les seuils de sensibilité du PremiTest et les limites fixées par la réglementation (Tableau 13), les échantillons positifs contiendraient :

- ✓ Des résidus de sulfamides, de tétracyclines et d'aminosides à des teneurs deux fois supérieures aux LMRs (100 à 200 µg/kg) ;
- ✓ Des résidus de macrolides à des teneurs égales à la LMR (100 µg/kg) ;
- ✓ Des résidus de β-lactamines à des teneurs inférieures à la LMR (25 µg/kg).

**Tableau 13: Seuils de défectibilité des principales familles d'antibiotiques par le PremiTest par rapport aux LMRs dans les viandes de volailles (AFNOR,2006)**

Famille	Sulfamide	Tétracycline	Macrolide	$\beta$ -lactamine	Aminoside
Antibiotique	Sulfadimérazine	Oxytétracycline	Tylosine	Amoxicilline	Gentamycine
LMR ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	100	100	100	50	50
Limite de détection	2*LMR	2*LMR	LMR	0.5*LMR	>2*LMR

Ces résultats nécessitent la confirmation par d'autres méthodes qui permettront d'identifier la famille des antibiotiques présentent dans les échantillons.

### III. Résultats de la méthode de diffusion

Dans la méthode de diffusion, nous avons utilisé cinq souches bactériennes avec cinq différents antibiotiques. Le diamètre de la zone d'inhibition de chaque antibiotique standard avec les normes sont résumés dans le tableau 14.

**Tableau 14: Diamètre des zones d'inhibitions obtenues pour les antibiotiques testés avec les souches de références et normes**

Souche	antibiotique standard [C]	diamètre de la zone d'inhibition	la norme selon la Bio-analyse		
			R	I	S
<i>S. aureus</i>	Ampicilline 10 $\mu\text{g}$	30	<28		>29
<i>L. monocytogenes</i>	Triméthoprim 25 $\mu\text{g}$	32	<12	13-29	>29
<i>Salmonella spp</i>	Erhthromycine 15 $\mu\text{g}$	18	<11	12-14	>15
<i>E. coli</i>	Tétracycline 30 $\mu\text{g}$	28	<25	26-28	>29
<i>B. Subtilis</i>	Pénicilline 10 $\mu\text{g}$	33	<20	21-28	>29

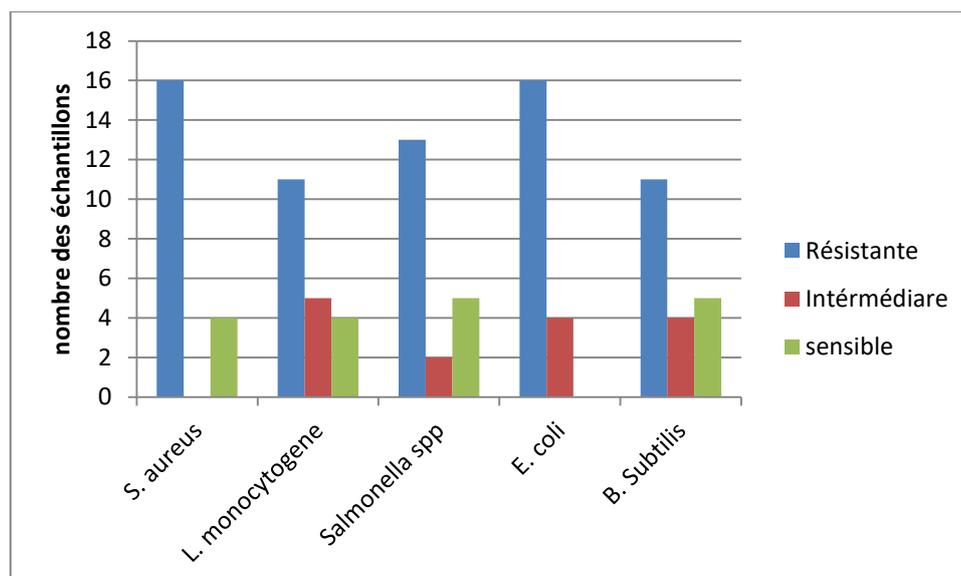
R : Résistante / I : Intermédiaire / S : Sensible

Les résultats de l'analyse de 20 échantillons par la méthode de diffusion sont résumés dans le tableau 15.

Tableau 15: Diamètre moyen des zones d'inhibitions en mm des échantillons obtenus

	Diamètre de la zone d'inhibition en mm									
Souches /Echantillons	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
<i>S. aureus</i>	30	18	-	14	10,5	-	-	29,5	-	11
<i>L. monocytogenes</i>	30	25	19	27	12	-	15	-	18	25
<i>Salmonella spp</i>	27	12	8	-	12	-	-	15	-	10
<i>E. coli</i>	28	-	-	12	-	-	10,5	28	-	14,5
<i>B. Subtilis</i>	33	21	15	22	-	-	15	32	20	27
	Diamètre de la zone d'inhibition en mm									
Souches /Echantillons	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20
<i>S. aureus</i>	-	-	10	15,5	30	-	-	-	30	11
<i>L. monocytogene</i>	-	-	19	12	32	-	-	-	30	15
<i>Salmonella spp</i>	-	-	17	-	30	-	-	-	18	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	28	-	-	-	28	14
<i>B. Subtilis</i>	-	23	29	17	29	-	18	20	33	20

- : diamètre de la zone d'inhibition inférieur à 7



**Figure 8 : Comparaison de la sensibilité des échantillons testés par rapport des souches utilisées**

Les résultats montrent que la souche de *S. aureus*, est sensible à l'ampicilline avec une concentration de 10 µg, et un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 30 mm. Parmi les 20 échantillons traités on a seulement 20% échantillons qui sont sensibles alors que les 80% des échantillons sont résistants.

Pour la souche de *L. monocytogenes*, le triméthoprime représente un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 32 mm, et parmi les 20 échantillons testés 20% sont sensibles à cette souche alors que 55% des échantillons sont résistants.

L'érythromycine présente une zone d'inhibition de l'ordre de 18 mm avec une concentration de 15 µg, donc pour la souche de *Salmonella spp*, 25% des échantillons sont sensibles et plus de 65% sont résistants à cette souche.

Pour *E. coli* la zone d'inhibition de la tétracycline est de l'ordre de 28 mm. Donc cette souche est très sensible à cet antibiotique. Dans 20 échantillons traités, 80% sont résistants à cette souche alors que 20% sont intermédiaires donc tous les échantillons ne contiennent pas des traces de tétracycline ou bien contiennent des résidus mais inférieurs à la concentration de 30 µg.

La souche de *B. Subtilis* est très sensible à la pénicilline car elle présente une zone d'inhibition de 33 mm de diamètre. On note également que plus de 25% des échantillons contiennent des résidus d'antibiotiques de pénicilline avec une concentration minimale de 10 µg alors que 55% sont résistants.

#### IV. Résultats de la méthode des quatre boîtes

La méthode des quatre boîtes permet l'identification de la famille des antibiotiques présente dans les viandes. L'utilisation des disques imprégnés de solutions d'antibiotiques témoins pour chaque milieu nous permet de vérifier la fiabilité de la technique. C'est-à-dire la bonne concentration en microorganismes tests et la sensibilité de ces derniers vis-à-vis de l'antibiotique, ce qui nous permet de déduire que les conditions opératoires sont crédibles. La présence de la zone d'inhibition s'explique par la présence des résidus d'antibiotiques dans les échantillons analysés, inhibant ainsi la croissance des microorganismes tests autour du disque de viande. (Pavlov et al., 2008).

La validation de la méthode des quatre boîtes nécessite une répétition 20 fois de chaque échantillon « TP1, TP2, TP3, TP4 et TN ». Les zones annulaires moyennes obtenues sont résumées dans le tableau 16.

**Tableau 16: Zone annulaire moyenne des témoins positifs et négatifs avec les normes**

Souches	pH	Antibiotique standard	Norme	zone annulaire moyenne en mm					
				Antibiotique	TP1	TP2	TP3	TP4	TN
<i>B. Subtilis</i>	6	Pénicilline	6±1 mm	7	7	6	3	6	0
<i>B. Subtilis</i>	8	DHS	5±1 mm	6	3	6	3	6	0
<i>M. luteus</i>	7,4	Sulfadimérazine	6±1 mm	6	6	6	6	5	0
<i>M. luteus</i>	8	Erythromycine	4±1 mm	5	4	5	4	5	0

- ✓ TP1 : Témoin positif de viande dopée par pénicilline.
- ✓ TP2 : Témoin positif de viande dopée par DHS.
- ✓ TP3 : Témoin positif de viande dopée par sulfadimérazine
- ✓ TP4 : Témoin positif de viande dopée par l'érythromycine.
- ✓ TN : Témoin négatif.

Les résultats de la validation de la méthode des quatre boîtes (tableau 16) montrent que la répétabilité 20 fois de chaque échantillon « TP1, TP2, TP3 et TP4 » donne des zones annulaires identiques à la norme, donc les souches bactériennes utilisées dans cette méthode sont très sensibles aux familles des antibiotiques testées.

Pour le TN, c'est le témoin négatif qui ne subit aucun traitement d'antibiotiques. Les résultats montrent une zone annulaire nulle pour les 20 répétitions. Donc les souches de *B. Subtilis* et *M. luteus* permet de détecter l'absence ou bien la présence des résidus des antibiotiques.

Après la validation, nous avons utilisé la méthode des quatre boîtes pour l'analyse des 20 échantillons.

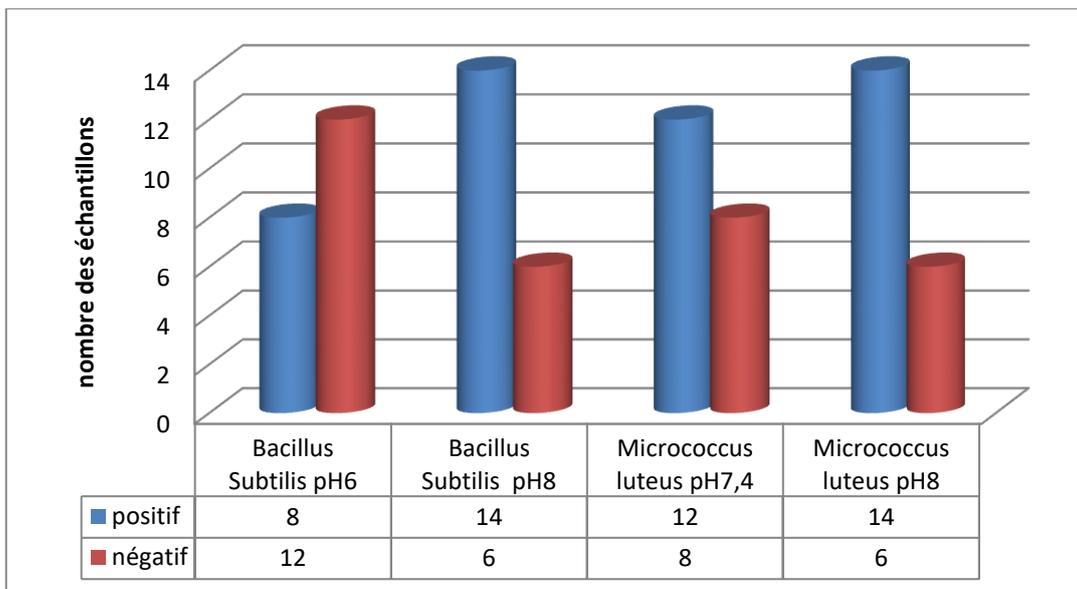
Pour chaque échantillon, la répétabilité deux fois permet de donner une zone annulaire moyenne qui doit être comparée avec la zone annulaire de l'antibiotique standard.

Le tableau 17 résume les résultats de la méthode des quatre boîtes pour les 20 échantillons.

Tableau 17: Zone d'inhibition moyenne en mm des échantillons analysés

				<i>zone annulaire en mm</i>										
Souche	pH	Antibiotique standard	Norme	Antibiotique	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
<i>B. Subtilis</i>	6	Pénicilline	6±1 mm	7	3	3	4	-	5	5	5	5	5	4
<i>B. Subtilis</i>	8	DHS	5±1 mm	6	5	3	4	-	5	5	4	5	6	4
<i>M. luteus</i>	7,4	sulfadimérazine	6±1 mm	6	4	3	5	-	3	5	6	6	6	-
<i>M. luteus</i>	8	Erythromycine	4±1 mm	5	5	4	-	-	4	4	4	3	4	5
				<i>zone annulaire en mm</i>										
Souche	pH	Antibiotique standard	Norme	Antibiotique	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20
<i>B. Subtilis</i>	6	Pénicilline	6±1 mm	7	4	4	-	3	3	4	7	6	3	6
<i>B. Subtilis</i>	8	DHS	5±1 mm	6	3	4	-	3	3	5	5	6	6	5
<i>M. luteus</i>	7,4	Sulfadimérazine	6±1 mm	6	3	6	-	5	6	6	2	7	5	6
<i>M. luteus</i>	8	Erythromycine	4±1 mm	5	4	5	-	2	4	2	-	4	4	4

- Absence de zone annulaire

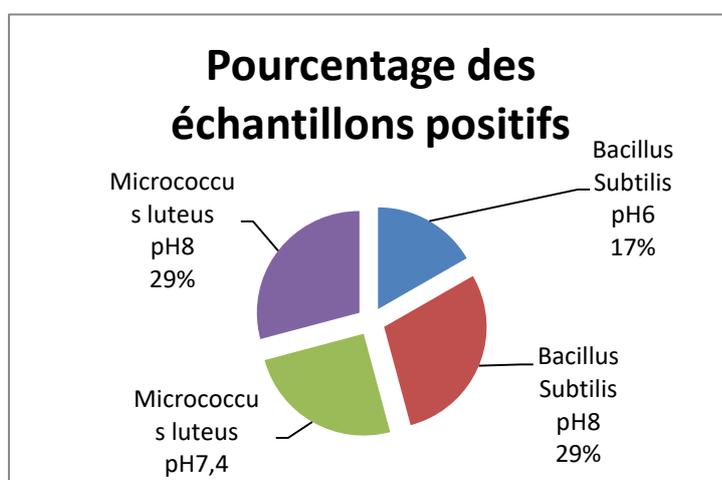


**Figure 9 : Comparaison de la présence des résidus des antibiotiques entre les souches de *B. Subtilis* et *M. luteus***

Pour la souche de *Bacillus* à pH 8, 70% des échantillons sont considérés comme positifs donc il y a la présence des traces de pénicilline, alors que pour la même souche à pH 6, seulement 40 % des échantillons sont positifs donc il y a présence des résidus des antibiotiques de la famille de DHS.

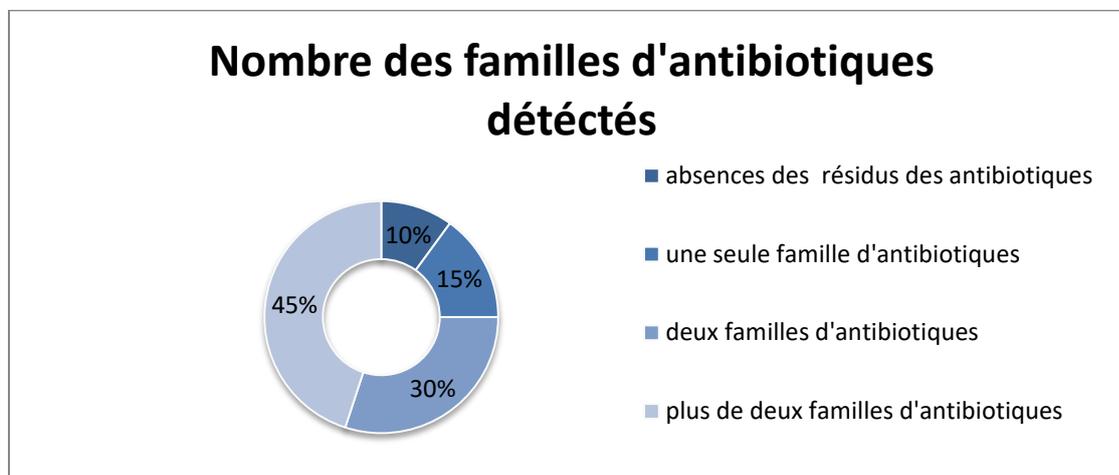
La souche de *Micrococcus* à pH 8 représente un pourcentage de 70% des échantillons positifs alors que pour la même souche à pH 7,4 un taux de 60 % des échantillons contenant des traces de sulfadimérazine a été enregistré.

Donc les deux souches de *Bacillus* et *Micrococcus* à pH 8 permettent de détecter les résidus des antibiotiques présents dans les échantillons avec un pourcentage de plus de 57%.



**Figure 10: Pourcentage des échantillons positifs selon les souches de références**

Les résultats obtenus par cette méthode (tableau 17) permettent la détection de nombre de famille d'antibiotiques présentés dans chaque échantillon. Par exemple, l'échantillon E5 contient des résidus des quatre familles d'antibiotiques utilisées.



**Figure 11: Répartition des résultats selon le nombre des familles d'antibiotiques détectés**

D'après la figure 11, seulement 10% des échantillons ne présente pas des résidus d'antibiotiques. Ce résultat pourrait s'expliquer soit par l'absence de ces molécules, soit par leur présence mais à une quantité indétectable.

Nous observons que 45% des échantillons analysés étaient positifs à plus de deux familles d'antibiotiques, 30% sont positifs à deux familles d'antibiotiques et 15% positifs à une seule famille d'antibiotique. Certains échantillons sont apparus positifs pour plusieurs familles d'antibiotiques. Ce qui suggère que ces animaux ont reçu plusieurs familles d'antibiotiques, soit pour des fins thérapeutiques (association d'antibiotiques), soit comme promoteurs de croissance.

On peut donc conclure que l'utilisation de la méthode des quatre boîtes pour l'analyse de nos échantillons, montre que les souches de *B. subtilis* et *M. luteus* sont les souches les plus fréquemment utilisées pour la recherche des résidus d'antibiotiques dans la viande après avoir testé leur sensibilité vis-à-vis des quatre molécules couramment utilisées en médecine vétérinaires.

Selon **Oufella et Smail (2012)**, plus de 30% des échantillons analysés étaient positifs à plus de deux familles d'antibiotiques simultanément, 10% à deux familles d'antibiotiques simultanément et 3,33% positifs à une seule famille d'antibiotique. Selon **Duval et soussy (1990)**, l'association d'antibiotiques est prescrite dans le souci d'élargissement du spectre d'activité et cela soit à titre de traitement d'urgence en cas de maladie grave non diagnostiquée avec précision. Soit pour traiter une infection mixte, à plusieurs germes, ou supposée telle.

Alors que **Brugère (1992)**, considère l'association de plusieurs antibiotiques comme étant une issue afin d'éviter tout échec thérapeutique et aussi pour élargir le spectre d'activité.

La présence des résidus d'antibiotiques est probablement liée à un traitement des animaux suivi d'un délai d'attente insuffisant. En effet, le non-respect de ce délai cause l'augmentation de la teneur des résidus d'antibiotique dans les denrées alimentaires, d'où leur inconformité (**Laurentie et sanders, 2002**).

L'utilisation abusive et anarchique des antibiotiques comme facteurs de croissance serait due à :

- ✓ Aux vétérinaires qui ont tendance à prescrire des traitements sans visite, ni consultation des animaux.
- ✓ Aux éleveurs dont la consultation des vétérinaires est instable et pratiquant souvent l'automédication **Abiola et al. (2005)**.

#### V. Résultat de la méthode turbidimétrique

La méthode turbidimétrique est une méthode quantitative de la détection des résidus des antibiotiques.

Les résultats de la mesure de l'absorbance des neuf échantillons testés sont résumés dans le tableau 18 et par extrapolation sur la courbe d'étalonnage, nous avons déduit la concentration de la pénicilline pour chaque échantillon.

**Tableau 18: Absorbances mesurées et concentration obtenues par extrapolation pour les 9 échantillons analysés**

Echantillon	Absorbance	Concentration µg/g
E1	0,156	0,19
E2	0,214	0,43
E3	0,177	0,28
E4	0,115	0,02
E5	0,119	0,04
E6	0,302	0,79
E7	0,158	0,20
E8	0,133	0,10
E9	0,127	0,07

Les résultats obtenus montrent la présence de l'antibiotique recherché (pénicilline) dans six échantillons parmi les neuf analysés à une concentration variant de 0,10 à 0,79 µg/g. Cette situation pourrait s'expliquer par le fait que les pénicillines sont considérées parmi les antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire et que leur délai d'attente est assez long de

l'ordre de 21 j.

Alors que pour la même méthode réalisée par **Ramdane (2015)**, la recherche des résidus de l'antibiotique (oxytétracycline) pour le même nombre d'échantillons analysés présente une concentration variant de 0,61 à 0,96 µg/g. donc la présence des traces des antibiotiques dans tous les échantillons. Cela est dû à l'utilisation abusive de cet antibiotique par les médecins vétérinaires, et le délai d'attente de l'oxytétracycline qui est de l'ordre de 7j.

**Tableau 19: Comparaison entre les différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques**

Test	Test Charm II	PremiTest	Méthode de diffusion	Méthode des quatre boîtes	Méthode turbidimétrique
Principe	La radioactivité entre un traceur marqué au $^3\text{H}$ et un récepteur marqué à l'antibiotique recherché	l'inhibition de la croissance du <i>Bacillus stearothermophilus</i> , bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques	l'étude de la sensibilité des souches de référence aux antibiotiques recherchés.	L'inhibition de la croissance de deux souches bactériennes les plus sensibles aux familles des antibiotiques	la densité optique d'une suspension est proportionnelle à la masse des particules en suspension.
Nature	Qualitatif	Qualitatif	Qualitatif	Qualitatif	Quantitatif
Durée	1 jour	1 jour	3 jours	15 jours	1 jour
Capacité de détection	LMR	2*LMR	LMR	LMR	Concentration de l'antibiotiques
Avantages	Rapide. Spécifique.	Rapide.	Sensibilité à plusieurs souches bactériennes.	Spécifique Méthode officielle de détection des résidus	Rapide. Mesure la [ ] de l'antibiotique. Spécifique.
Inconvénients	-	Non spécifique. Capacité de détection est faible.	Méthode lourde.	Long. Méthode lourde.	-

## Conclusion

La consommation des viandes blanches augmente progressivement au Maroc, vu la qualité nutritionnelle et le prix accessible de cette dernière. Il est donc impératif de veiller à la bonne qualité, tant sur le plan hygiène que sur le plan microbiologique.

Notre travail nous a permis d'établir un protocole d'analyse avec différentes méthodes de détection des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles.

La méthode des quatre boites a révélé la présence des échantillons contaminés par plusieurs familles d'antibiotiques, soit 45% sur la totalité des échantillons analysés.

Les pourcentages élevés des résidus d'antibiotiques présents dans le muscle est de l'ordre de 70% pour *Bacillus Subtilis* et *Micrococcus leutus* à pH 8. Ceci, nous renseigne sur l'usage abusif et anarchique des antibiotiques dans l'élevage des volailles.

En plus, il convient de signaler que l'utilisation intensive des antibiotiques, particulièrement en médecine vétérinaire, pose de sérieux problèmes que chaque utilisateur doit connaître.

Souvent faite sans antibiogramme préalable, l'antibiothérapie animale continue à constituer un risque pour la santé humaine ; ce risque peut être de deux ordres. L'un dû à la contamination de l'homme par des bactéries zoonotiques résistantes à des antibiotiques utilisés en médecine humaine. L'autre posé par les résidus persistants dans les denrées alimentaires de consommation (Chalus-Dancla, 2003).

Le contrôle de ces résidus dans les denrées alimentaires est un processus complexe et coûteux, mais il reste indispensable pour garantir la protection de la santé publique, le respect des règles qui régissent le commerce, et la production de matières premières de qualité pour l'industrie agroalimentaire.

Vu les résultats obtenus dans notre étude, les causes majeures de la présence des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles sont probablement:

- ✓ L'utilisation anarchique des antibiotiques.
- ✓ Le non-respect du délai d'attente
- ✓ Absence de test de dépistage.
- ✓ Absence de méthode de détection de résidus d'antibiotiques.

Pour résoudre ses problèmes il faut :

- ✓ Augmenter le nombre des plans de contrôle réalisé par l'ONSSA.
- ✓ La mise en pratique des normes en matière de résidus par des structures qualifiées.
- ✓ Les éleveurs doivent être sensibilisés sur les dangers qui présentent les résidus d'antibiotiques.
- ✓ Respecter les règles de bonnes pratiques d'élevage (B.P.E.).

## Références bibliographiques

1. **ABIOLA F.A., DIOP M. M., TEKOAGBO A., DELEPINE B., BIAOU F.C., ROUDOU T.B., GAUDIN V.et SANDERS P. (2005).** Résidus d'antibiotiques dans le foie et le gésier du poulet de chair dans les régions du Dakar et de Thiès (Sénégal). *Revue Méd.Vét*, 156 : N5, P 268. (Sénégal).
2. **AFNOR. (2006).** Rapport d'étude préliminaire pour la validation AFNOR du Premi®Test.
3. **AFNOR (2011),** Rapport de synthèse de l'étude de validation du Premi® Test, test de détection des résidus d'antibiotiques dans le muscle.
4. **AFSSA. (2011).** Détection des résidus à activité antibiotique dans le muscle. Méthode des quatre boites. LMV/90/01- version 7.
5. **ANSES (2008).** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Tableau de composition nutritionnelle Ciqual.
6. **BECKER M., ZITTLAU E., et PETZ M. (2004).** Residus analysis of 15 penicillins and céphalosporine in bovine muscle, Kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica. Acta.* 520:P 1932.
7. **BELHADJ M.T. 2008 -** Contribution à l'étude de la qualité bactériologique des viandes blanches commercialisées dans la Wilaya de Bordj Bou Areridj. Mémoire de Magistère, Ecole nationale vétérinaire El Harrach, Alger.
8. **BELMAHDI M. (2010).** Étude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées de la volaille. Thèse de magister.
9. **BOUKHALFA L. (2006).** L'aviculture en Algérie. Journée sur la grippe aviaire. Batna. Algérie. Les 15 et 16 mars 2006.
10. **BRUGERE H. (1992).** Pharmacologie chez les oiseaux. In : Manuel de pathologie aviaire. Eds Brugère-Picoux J et Silim A., Imprimerie du cercle des élèves de l'ENV d'Alfort, Paris, France. P 355-363.
11. **BRUNELI V. JEHL N. DROUET T.L. PORTNEAU M.C. (2006).** Viandes de volailles. Science et technique. Viande prod. Carnés. V.25.
12. **Charm Science (2016).** INC OM-237-009 Août 2016.

13. **CHASLUS D. (2003).** Les antibiotiques en élevage. Etat des lieux et problèmes posés. INRA.
14. **CHATAIGNER B. (2004).** Etude de la qualité sanitaire des viandes bovines et ovines à Dakar (Sénégal). Contamination par des résidus d'antibiotiques. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse (France).
15. **DELEPINE B. HURTAUD-PESSELD et SANDERS P. (2002).** Les méthodes récentes d'analyse physico-chimique des résidus d'antibiotiques dans le lait. Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires. 15 : P 191-196.
16. **DIAZ CRUZ M.S. et BARCELO D. (2007).** Recent advances in Lc-Ms residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. T.R.A.C. 26:P 637-646.
17. **DUVAL J. et SOUSSY C.J. (1990).** Antibiothérapie. Masson. Ed 4.
18. **EUCAST. (2014).** Détermination de la Sensibilité aux Antibiotiques Méthode de diffusion de l'EUCAST en gélose, version 4.
19. **FAGBAMILA I., KABIR J., ABDU P., OMEIZA G., ANKELI P., NGULUKUN S., MUHAMMAD M. and UMOH J. (2010).** Antimicrobial screening of commercial eggs and determination of tetracycline residue using two microbiological methods. Bacterial Research Division, National Veterinary Research Institute. P.O. Box 01., Plateau State, Nigeria, p. 1.
20. **GAUDIN V. FABRE J.M. and RAULT A. (2006).** Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse- application à la détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires. Laboratoire d'étude et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. Laboratoire communautaire de référence. FOUGERES. France.
21. **Hakem A., TITOUCHE Y., HOUALI K., YABRIR B., MALKI O., CHENOUF N., YAHIAOUI S., LABIAD M., GHENIM H., KECHIH-BOUNAR S., CHIRILA F., LAPUSAN A. and FIT N.I. (2013).** Screening of Antibiotics Residues in Poultry Meat by Microbiological Methods. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine.P 77.
22. **KANTATI Y.T. (2011).** Détection des résidus d'antibiotiques dans les viandes de bovins prélevées aux abattoirs de Dakar. Mémoire de master qualité des aliments de l'homme, spécialité : Produits d'origine animale, Ecole Inter-états des Sciences et Médecine vétérinaires (EISMV), Dakar.

23. **KENNEDY D.G., MAC-CRACKEN R.J., CANNAVAN A. et HEWITT S.A. (1998).**  
Use of LC/MS in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of chromatography*. 812: P: 77-98.
24. **KUMMERE K. (2009).** Antibiotics in the aquatic environment. A review, Part I, *Chemosphere*, 75 (4): 4170.
25. **LAURENTIE M., SANDER P. (2002).** Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*. (15): 197201.
26. **MENSAH S.E.P., KOUDANDE O.D., SANDERS P., LAURENTIE M., MENSAH G.A. et ABIOLA F.A. (2014).** Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, P 33.
27. **OUFELLA.M et SMAIL .F. (2012).** Détection des résidus d'antibiotiques dans la viande du poulet de chair. Mémoire de fin cycle en science alimentaire. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
28. **OIE. (2010).** Code sanitaire pour les animaux terrestres- Volume 1. Dix-neuvième édition. ISBN 978-92-9044-7726. Copyright OMSA.
29. **PAVLOV AL., LASHEV L., VACHIN I., RUSEV.V. (2008).** residus of antimicrobial DRUGSIN chicken meat and offal's. *Trakia journal of science*. 6 : P 23-25.
30. **Pharmacopée européenne 6.0**
31. **RAMDANE M.S. 2015.** Etude qualitative et quantitative des résidus d'antibiotiques dans la viande de volaille et les œufs dans la région de la Mitidja. Utilisation des probiotiques comme alternative. Thèse de doctorat sciences biologiques .Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
32. **SANDERS P. 2005.** L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. *Bull. Acad. Vét. France*, 158 (2) : P 137.
33. **SANDERS P., BOUSQUET-MELOU A., CHAUVIN C. et TOUTAIN P.L. (2011).** Utilisation des antibiotiques en élevages et enjeux de santé publique. Ed. INRA Prod. Anim., 24 (2):P 194-200.
34. **STOLTZ R. (2008).** Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale. Evaluation et maîtrise de ce danger .thèse de doctorat. Université Claud Bernard-Lyon I (France). P1.
35. **STOR K. et MESLIN F.X. (1998).** Des antimicrobiens pour les animaux de boucherie. *Santé du monde*. N°4.P 12.

36. **TALBERT M., WILLOQUET G. et GERVAIS R. 2009** - Pharmaco clinique le guide. Ed. le moniteur, Paris. P 254-665.
37. **VAN DEN BOGAOR A.E. (2001)**. Human health aspects of antibiotic use in food animals. Review tijdschrift voor diergeneeskunde. V.126. N°18.P590-595.
38. **ZEGHILET N. (2009)**. Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques de la viande blanche par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Thèse de magister en médecine vétérinaire. Université Mentouri de Constantine, Faculté des sciences, Département des sciences vétérinaire, Constantine. Algérie.

**Sites Internet :**

[www.agrimaroc.ma](http://www.agrimaroc.ma)

[www.onssa.gov.ma](http://www.onssa.gov.ma)

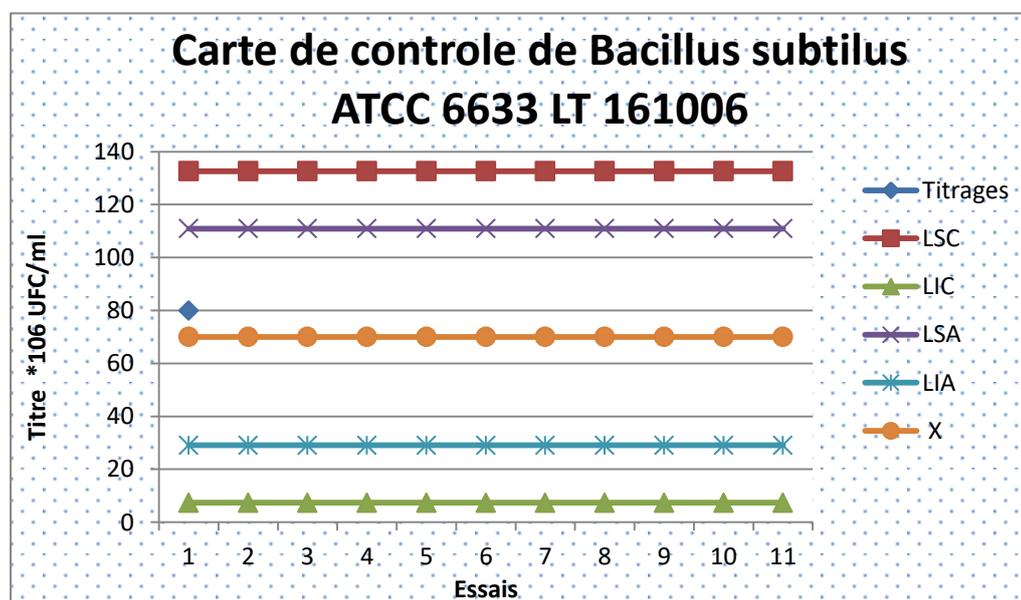
[www.fisamaroc.org.ma](http://www.fisamaroc.org.ma)

[www.salon-agriculture.ma](http://www.salon-agriculture.ma)

## Annexes

Annexe 1 : Carte de contrôle de *Bacillus Subtilis*

Carte de contrôle de bacillus subtilus ATCC 6633 LT 161006 DPIV RABAT								
				Exp:19-04-2019				
				X+3ET	X-3ET	X+1,96ET	X-1,96ET	Moyenne
Date	Essai	Titre* 10 <sup>6</sup> UFC/mL	Titrages	LSC	LIC	LSA	LIA	X
23/04/2018	1	46	80	132,6	7,4	110,9	29,1	70
23/04/2018	2	84		132,6	7,4	110,9	29,1	70
23/04/2018	3	80		132,6	7,4	110,9	29,1	70
				132,6	7,4	110,9	29,1	70
				132,6	7,4	110,9	29,1	70
				132,6	7,4	110,9	29,1	70
	Moyenne	<b>70</b>		132,6	7,4	110,9	29,1	70
	Ecart-type	20,88		132,6	7,4	110,9	29,1	70
	X+3ET	132,64		132,6	7,4	110,9	29,1	70
	X+1,96ET	110,93		132,6	7,4	110,9	29,1	70
	X-3ET	7,36		132,6	7,4	110,9	29,1	70
	X-1.96ET	29,07						



- ✓ LSC : limite supérieure de contrôle
- ✓ LIC : limite inférieure de contrôle
- ✓ LSA : limite supérieure d'acceptabilité
- ✓ LIA : limite inférieure d'acceptabilité

## Annexe 2 : Composition et préparation des milieux de culture

### 1. Milieux tests agar

Test agar pH6	Composition (g/l)	Test agar pH7.4 et pH8	Composition (g/l)
peptone de caséine triptyque	3.45	peptone de caséine triptyque	3.45
peptone de viande triptyque	3.45	peptone de viande triptyque	3.45
sodium chlorure	5.1	Sodium chlorure	5.1
Agar agar	13	trisodium phosphate	2.4
		Agar agar	13

### 2. Milieux de sporulation et Tryptone Soja Agar

TSA pH 7	Composition (g/l)	Milieu de sporulation pH7	Composition (g/l)
Peptone pancréatique de caséine	15	Peptone pancréatique de caséine	15
Peptone papaïnique de soja	5	Peptone papaïnique de soja	5
Chlorure de dodium	5	Chlorure de dodium	5
Agar agar	15	Sulfate de manganèse	0.03
		Agar agar	15

### 3. Milieu Mueller Hinton

MH pH 7.4	Composition (g/l)
peptone de caséine	17.5
amidon de maïs	1.5
infusion de viande de bœuf	300 mL
Agar agar	17

### 4. Milieu Bouillon Tryptone Soja

BTS pH 7.4	Composition (g/l)
Peptone de caséine	17
Peptone de soja	3
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2.5
Glucose monohydraté	2.5

## 5. Préparation

Dissoudre la composition de chaque milieu dans 1 L d'eau distillée, chauffer au bain marie en agitant jusqu'à l'obtention d'une phase homogène vérifier le pH et éventuellement le corriger puis mettre le milieu dans autoclave à une température de 121°C pendant 15 minutes puis laisser refroidir.

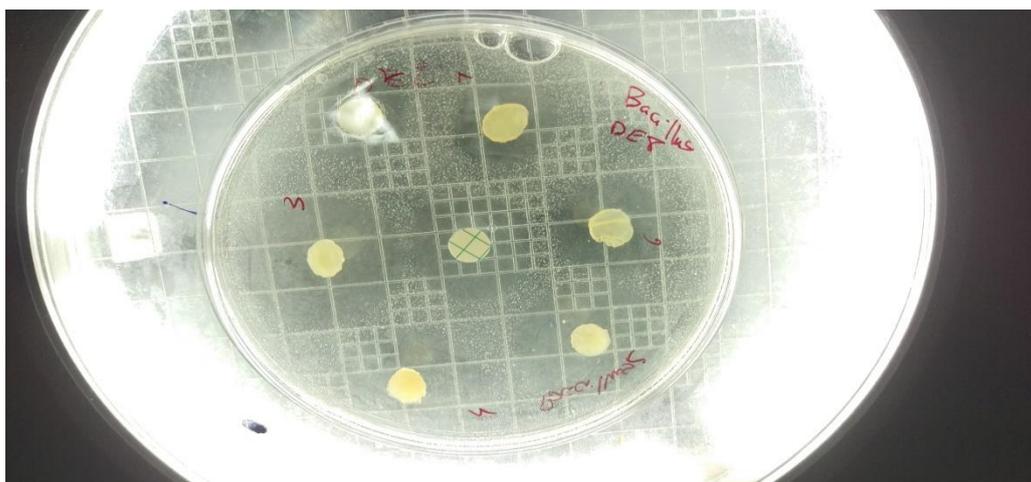
### Annexe 3 : Identification des souches bactériennes

	<i>B. Subtilis</i>	<i>M. Leutus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogène</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>E. coli</i>
<b>Gram</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Oxydase</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Couagulase</b>			+			
<b>Api</b>	50 CHB		Staph	Listeria	20 E	20E

### Annexe 4 : Images des résultats de la méthode de diffusion



### Annexe 5 : Image des résultats de la méthode des quatre boîtes





Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



Filière Ingénieurs IAA

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'ingénieur d'Etat

**Prénom et Nom: Khadija HALMAOUI**

**Année Universitaire : 2017/2018**

**Titre: La détection des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles.**

### Résumé

Durant ce présent travail, nous avons utilisé différentes méthodes qualitatives et quantitatives de détection des résidus des antibiotiques dans les viandes de volailles.

La validation de la méthode de référence des quatre boîtes permet de vérifier la fiabilité des souches utilisées, En effet les deux souches bactériennes de *Bacillus Subtilis* et *Micrococcus luteus* sont très sensibles à plusieurs familles des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire.

Les résultats des différentes méthodes aboutissent à un pourcentage élevé des échantillons positifs qui contient des traces des antibiotiques supérieurs à la LMR. Cela est dû aux nombreux facteurs parmi lesquels, le non-respect du délai d'attente, l'usage de ces molécules comme promoteur de croissance à titre préventif et l'usage abusif sans diagnostic et sans contrôle officiel.

**Mots clés :** Volaille, résidus d'antibiotiques, délai d'attente, LMR, antibiotique, Contrôle.

---

**Title: The detection of antibiotic residues in poultry meat.**

### Abstract

During this work, we used different qualitative and quantitative methods for detecting antibiotic residues in poultry meat. The validation of the reference method of the four boxes makes it possible to verify the reliability of the strains used. Indeed, the two bacterial strains of *Bacillus Subtilis* and *Micrococcus luteus* are very sensitive to the several families of antibiotics used in veterinary medicine. The results of the different methods lead to a high percentage of positive samples which contains traces of antibiotics above the MRL. This is due to the many factors among which, the non-compliance with the waiting period, the use of these molecules as promoters preventative growth and misuse without diagnosis and without official control.

**Key words:** Poultry, antibiotic residues, withdrawal time, MRL, antibiotic, control.