

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR  
(UCAD)**

**ECOLE INTER - ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES  
(E.I.S.M.V.)**

**ANNEE 2006**



**N°36**

**INVESTIGATION SUR LA PRESENCE DE RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES  
DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE AVIAIRE COMMERCIALISEES A  
ANTANANARIVO (MADAGASCAR) : CAS DU MUSCLE ET DU FOIE**

**THESE**

**Présentée et soutenue publiquement**

**LE 28 OCTOBRE 2006**

devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar  
pour obtenir le grade de **DOCTEUR VETERINAIRE**  
**(DIPLÔME D'ETAT)**

Par

**Riana Nantenaina RANDRIANOMENJANAHARY**

Née le 01 Octobre 1978 à Antananarivo (MADAGASCAR)

---

**JURY**

**Président :**

**M. Abibou SAMB**

Professeur à la Faculté de Médecine, de  
Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar

**Directeur et**

**Rapporteur de Thèse :**

**M. Malang SEYDI**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Membre :**

**Mme Rianatou BADA-ALAMBEDI**

Maître de conférence agrégé à l'EISMV  
de Dakar

---

## COMPOSITION DU JURY

**Président :**

**M. Abibou SAMB**

Professeur à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar

**Directeur et**

**Rapporteur de Thèse :**

**M. Malang SEYDI**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Membre :**

**Madame Rianatou BADA-ALAMBEDJI**

Maître de conférence agrégé à l'EISMV de Dakar

« Par délibération, la faculté et l'école ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation, ni improbation »

## DEDICACES

Je dédie ce travail :

### ***A mes parents***

Pour tout l'amour dont vous m'avez entouré et pour votre abnégation afin que je puisse réussir mes études et ma vie, trouvez ici le fruit de tous vos efforts et l'expression de toute mon affection.

### ***A mon épouse***

Pour ton soutien, ton amour et le bonheur dont tu me combles, trouve ici l'expression de tout mon amour et ma reconnaissance.

### ***A mon fils***

Sois meilleur que je ne le suis !  
Puisses-tu réussir là où j'ai échoué !

### ***A mon frère et à mes sœurs***

Pour votre appui et vos encouragements, trouvez ici l'expression de ma reconnaissance.

### ***A la famille RAMASITERA***

Trouvez ici l'expression de toute mon affection et que Dieu vous comble de ses bienfaits

### ***A mes amis et mes compatriotes de Dakar***

Pour les merveilleux moments passés ensemble.

***A la promotion Oumy Khaïry Gueye SECK (33<sup>ème</sup> promotion) et à  
notre professeur accompagnateur Ayao MISSOHOU.***

***A Madagascar, ma chère patrie.***

***Au Sénégal, mon pays hôte.***

## Remerciements

**A toutes les personnes physiques et morales qui ont contribué à la réalisation de ce travail :**

- A mon père pour ses conseils et son aide ;
- A mon beau père pour son appui et son soutien ;
- A la famille RAMANANKANTENAINA sans qui cette thèse n'aurait jamais pu se faire ;
- Au Professeur Malang SEYDI qui a accepté de diriger mes travaux ;
- A ma sœur Tahina RANDRIANOMENJANAHARY pour m'avoir permis de faire appel à ses talents en informatique ;
- A mon frère Ando RANDRIANOMENJANAHARY pour être resté disponible pour m'aider durant mes travaux ;
- A tout le personnel de l'Agence pour le Contrôle de la Qualité des Denrées Alimentaires à Madagascar ;
- A mes amis Justin KOUAMO, BIJVE YATUA et Souleyman MAHONTE pour leur conseils et appui ;
- A tout le personnel du centre de documentation du Ministère de la Population et des Conditions Féminines ;
- A tout le personnel de la Direction de la Santé Animale et du Phytosanitaire.

## **A nos maîtres et juges**

**A notre Maître et Président de jury, Monsieur Abibou SAMB,  
Professeur à la faculté de Médecine, de Pharmacie et  
d'Odontostomatologie de Dakar ;**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider notre jury de thèse. La spontanéité avec laquelle vous avez répondu à notre sollicitation nous a beaucoup marqué.

Veillez accepter nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

**A notre Maître, Juge et Directeur de Thèse, Monsieur Malang SEYDI,  
Professeur à l'EISMV de Dakar ;**

Vous avez accepté avec spontanéité de nous guider dans ce travail. Vos qualités intellectuelles et votre passion du travail bien fait ont suscité notre admiration. Nous sommes également très sensibles à la sympathie que vous nous avez témoignée tout au long de nos études.

Soyez assuré de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude.

**A notre Maître et Juge, Madame Rianatou BADA-ALAMBEDJI,  
Maître de conférence agrégé à l'EISMV de Dakar;**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce modeste travail malgré vos multiples occupations. Vos qualités humaines et intellectuelles exceptionnelles nous ont beaucoup marquées.

Veillez trouver ici l'assurance de notre profonde gratitude et de notre vive admiration.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

D.A.O.A. : Denrées Alimentaires d'Origine Animale

D.J.A. : Dose Journalière Admissible

F.A.O. : Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

GTS : Gélose Tryptone Soja

LMR : Limites Maximales de Résidus

LMRMV : Limites Maximales de Résidus de Médicaments Vétérinaires

O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé

P.A.B. : Para-Amino-Benzoïque

PNB : Produit National Brut

S.E. : Semence d'Essai

S.L.C. : Semences Longues Conservations

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Démographie de Madagascar .....	6
Tableau II : Principales villes de Madagascar.....	7
Tableau III : Statistiques des animaux d'élevage terrestre à Madagascar pour l'année 2003 .....	9
Tableau IV : Répartition des volailles selon les provinces .....	9
Tableau V : Les souches utilisées en élevage moderne.....	10
Tableau VI : Typologie des fermes d'élevage de poulets de chair.....	11
Tableau VII : Typologie des fermes d'élevage de poules pondeuses.....	11
Tableau VIII : Comparaison des prix de différentes sources protéiques vendues aux marchés d'Antananarivo .....	11
Tableau IX : Antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> (septembre 2006) .....	26
Tableau X : Matériel utilisé .....	30
Tableau XI : Microorganismes utilisés pour le test .....	31
Tableau XII : Taux de contamination par marché (en pourcentage).....	38
Tableau XIII : Comparaison des contaminants à l'intérieur des différents marchés (en pourcentage) .....	39
Tableau XIV : Comparaison des contaminations en fonction du mode d'élevage (en pourcentage) .....	40
Tableau XV : Comparaison des contaminations en fonction du prélèvement (en pourcentage) .....	42
Tableau XVI : Niveau de contamination de la chair de poulet (en pourcentage) .....	43
Tableau XVII : Niveau de contamination du foie de poulet (en pourcentage).....	44
Tableau XVIII : Contamination par un ou plusieurs types de résidus (en pourcentage) .....	45

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation géographique de Madagascar .....	4
Figure 2 : Taux de contamination par marché (en pourcentage).....	39
Figure 3 : Comparaison des contaminants à l'intérieur des différents marchés (en pourcentage) .....	40
Figure 4 : Comparaison des contaminations en fonction du mode d'élevage (en pourcentage) .....	41
Figure 5 : Comparaison des contaminations en fonction du prélèvement (en pourcentage) .....	42
Figure 6 : Niveau de contamination de la chair de poulet (en pourcentage).....	43
Figure 7 : Niveau de contamination du foie de poulet (en pourcentage) .....	44
Figure 8 : Contamination par un ou plusieurs types de résidus (en pourcentage)....	45

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR MADAGASCAR.....</b>	<b>4</b>
1.1. Le pays et ses ressources	5
1.2. Population et société	6
1.3. Economie	7
1.4. Importance de l'élevage aviaire à Madagascar	9
<b>CHAPITRE 2 : RAPPELS SUR LES PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES ETUDIEES.....</b>	<b>13</b>
2.1. Définition d'un antibiotique	13
2.2. Classification	13
2.3. Bêta-lactamines	13
2.4. Tétracyclines	15
2.5. Sulfonamides ou sulfamides	16
2.6. Aminosides	18
2.7. Macrolides	19
<b>CHAPITRE 3 : RISQUES LIES A LA PRESENCE DE RESIDUS ANTIBIOTIQUES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (DAOA).....</b>	<b>21</b>
3.1. Définitions	21
3.2. Résidus d'antibiotiques	22
3.3. Risques présentés par les résidus	23
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>28</b>
<b>CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>30</b>
1.1. Matériel	30
1.2. Méthode	31
<b>CHAPITRE 2 : RESULTATS.....</b>	<b>38</b>
2.1. Présence de résidus au niveau des carcasses et abats de volailles vendus dans la capitale	38
2.2. Etude comparative du taux de contamination au niveau de chaque marché	38
2.3. Familles d'antibiotiques incriminées dans la contamination au niveau de chaque marché	39
2.4. Impact du mode d'élevage dans le risque de présence de résidus d'antibiotiques chez la volaille	40
2.5. Variation du risque selon le produit de consommation acheté (chair ou foie)	42
2.6. Niveau de contamination selon le type de DAOA	43

2.7. Contamination multiple	45
<b>CHAPITRE 3 : DISCUSSIONS ET RECOMMANDATIONS</b>	<b>46</b>
3.1. Discussions	46
3.2. Recommandations	49
<b>CONCLUSION</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>55</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>59</b>

## INTRODUCTION

Le développement de l'élevage aviaire dans le monde s'est accompagné de l'augmentation de la demande en antibactérien par voie orale. Ces médicaments, administrés ou non par un vétérinaire, peuvent présenter un risque pour le consommateur. C'est pour gérer ces risques et les conséquences commerciales et économiques qu'ils entraînent que la commission mixte FAO/OMS du Codex Alimentarius a été mise en place. Il dispose d'un comité responsable de résidus des médicaments vétérinaires. Entre autres fonctions, il a pour rôle de protéger le consommateur, d'assurer une pratique loyale dans le commerce international (barrière sanitaire) et de promouvoir la coordination de tous les travaux en matière de normes alimentaires.

A Madagascar, l'apparition soudaine et rapide de la peste porcine africaine a fait que des familles entières se sont reconverties en aviculteurs. L'élevage aviaire ne nécessitant que des moyens relativement modérés, le passage d'une filière à l'autre s'est fait avec l'appui de différentes structures pour certains (USAID) et sans aucune aide pour d'autres.

De plus, le vide laissé par le manque de produits alimentaires provenant des porcs devait être comblé. La demande de la population en protéines d'origine aviaire a alors normalement augmentée.

Le développement de l'aviculture malgache s'est accompagné d'une croissance de la consommation en médicaments vétérinaires. Or, l'emploi non raisonné de ces derniers fait qu'ils se retrouvent dans la denrée produite (muscle et foie). Cette présence sous forme de «résidu » présente un risque pour le consommateur.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la qualité des produits avicoles consommés à Antananarivo, la capitale du pays.

L'objectif de cette étude est de faire état de la qualité des produits avicoles commercialisés à Antananarivo par la recherche des résidus d'antibiotiques.

Cette étude nous permettra de situer les risques par rapport :

- à la denrée (muscle et foie),
- au marché (supermarché ou marché à ciel ouvert) ;
- au type d'élevage (traditionnel ou moderne).

Il nous donnera également une idée sur le niveau de contamination et sur les contaminations multiples pour chaque type d'aliment.

Ce travail sera structuré en deux grandes parties :

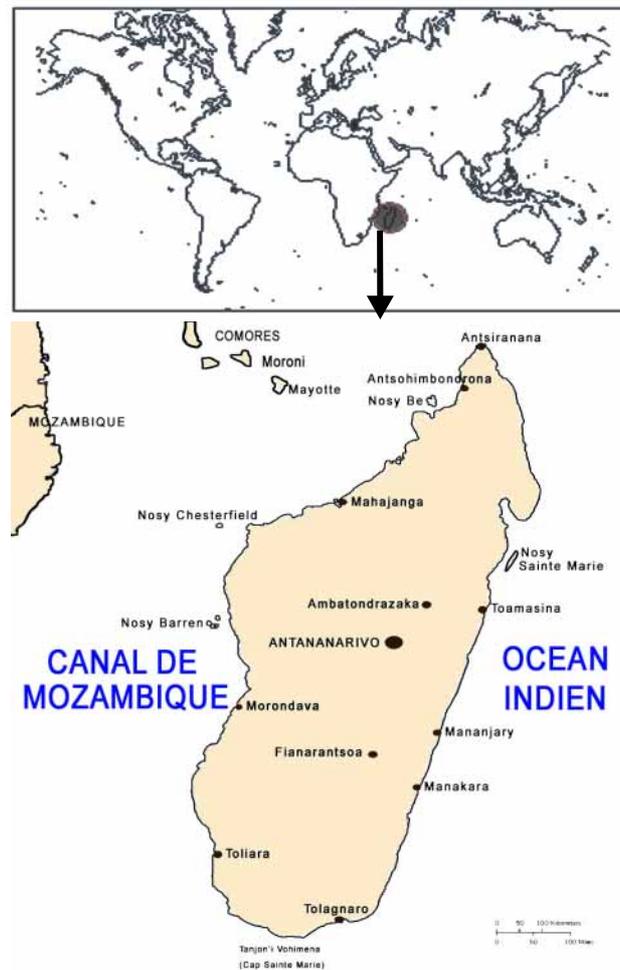
- une première partie intitulée « synthèse bibliographique » est subdivisée en trois chapitres :
  - le premier chapitre intitulé « généralités sur Madagascar » présentera le pays et la place qu'y occupe l'élevage avicole ;
  - le deuxième chapitre rappellera les principales caractéristiques des familles d'antibiotiques abordées par l'étude ;
  - et le troisième chapitre fera le point des connaissances sur les « risques liés à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale » ;
- une deuxième partie consacrée à « l'étude expérimentale » sera également subdivisée en trois chapitres :
  - le premier chapitre traitera du matériel utilisé pour l'étude et de la méthode ;
  - le deuxième chapitre donnera les résultats d'analyse ;
  - et le dernier chapitre est dédié à la discussion des résultats et aux recommandations.

**PREMIERE PARTIE :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR MADAGASCAR

Madagascar est un pays formé par plusieurs îles dont l'île principale est appelée « Madagasikara ». D'une superficie de 587051km<sup>2</sup>, il est bordé à l'Est par l'Océan Indien et à l'Ouest par le Canal de Mozambique. C'est donc un pays qui se trouve au large de la côte sud-est de l'Afrique.

**Figure 1 : Localisation géographique de Madagascar**



## **1.1. Le pays et ses ressources**

### **1.1.1. Relief**

La zone centrale de l'île est très montagneuse et est appelée « Hautes Terres » ou « Hauts Plateaux ». Il s'agit d'un plateau montagneux de 800 à 1200m d'altitude. Cependant, quelques montagnes culminent au-delà de 2500m (c'est le cas d'Ankaratra qui se trouve non loin de la Capitale et qui culmine à 2643m).

La côte Est malgache est constituée par une bande de terre étroite tandis que vers l'Ouest, le pays dispose de grandes plaines fertiles.

### **1.1.2. Hydrographie**

En matière d'hydrographie, le pays dispose d'un grand nombre de fleuves et de lacs. Les fleuves les plus importants du pays coulent vers l'Ouest à travers des grandes vallées fertiles et terminent leurs courses dans le Canal de Mozambique. Il s'agit surtout de Betsiboka, Tsiribihina, Onilahy et Mangoka.

Les fleuves à l'Est sont en général plus courts et constituent souvent des cascades avant de se terminer dans l'Océan Indien. Ces fleuves sont souvent exploités pour la production d'énergie.

Le lac le plus exploité du pays en matière d'agriculture et d'élevage est le lac Alaotra qui se trouve à l'Est d'Antananarivo, la capitale du pays.

### **1.1.3. Climat**

L'île dispose d'un climat très variable d'Est en Ouest et du Nord au Sud. L'Est et le Nord du pays sont des régions pluvieuses qui se caractérisent par 3050mm de précipitations par an. Le Sud et l'Ouest sont des zones plutôt sèches ne bénéficiant que de 380mm de pluies annuelles. Cependant, malgré ces variations, la côte malgache bénéficie d'un climat chaud quasiment toute l'année.

Dans les Hauts Plateaux, on distingue deux saisons de six mois chacune : une saison chaude et pluvieuse correspondant à l'été de novembre à avril et une saison sèche et froide appelée hiver.

#### **1.1.4. Faune et Flore**

85% des espèces végétales et 90% des espèces animales malgaches sont endémiques. Néanmoins, beaucoup sont menacés d'extinction à cause d'une déforestation massive et incontrôlée.

#### **1.1.5. Ressources minières**

Le sous-sol malgache est surtout riche en bauxite, chrome, nickel, graphite, minerai de fer, charbon, cuivre, ilménite et du pétrole offshore bien qu'on y trouve également de l'or, des saphirs ainsi que de l'uranium.

### **1.2. Population et société**

#### **1.2.1. Démographie**

Les données actuellement disponibles auprès du Ministère de la population sont ceux de 2002.

**Tableau I : Démographie de Madagascar**

<b>Caractéristiques</b>	<b>MADAGASCAR</b>	<b>ANTANANARIVO</b>
Population	15981000	4723000
Superficie	587051	58283
Densité	27hab/km2	81hab/km2
Croissance démographique annuelle (%)	2,9	3
Population de 0 à 14 ans (%)	44,4	43,3
Population de 60 ans et plus (%)	4,6	4,6
Espérance de vie	52 ans	52 ans
Mortalité infantile (pour mille)	77	152
Taux de fécondité (nombre de naissance par femme)	6,1	5,7
Usage contraception (%)	27,1	
Taux d'alphabétisation (%)	53,5	70,2

Source : [19]

### 1.2.2. Langues et religions

Bien que le français soit utilisé comme langue d'enseignement dans les grandes villes et les universités du pays, Madagascar possède une langue propre appelé « le malgache ». C'est une langue parlée et écrite commune à tous les Malgaches.

En matière de religions, on sait que :

- 52% de la population ont gardé leurs croyances traditionnelles d'origine africaine ou malayo-polynésiennes ;
- 41% sont chrétiens ;
- et 7% sont musulmans.

### 1.2.3. Villes principales

Chaque province dispose d'une ville principale.

**Tableau II : Principales villes de Madagascar**

<b>Province</b>	<b>Ville principale</b>
ANTANANARIVO	ANTANANARIVO ou TANA
ANTSIRANANA	DIEGO
TOAMASINA	TAMATAVY ou TAMATAVE
MAHAJANGA	MAHAJANGA ou MAJUNGA
FIANARANTSOA	FIANARANTSOA ou FIANAR
TOLIARA	TOLIARA ou TULEAR

## 1.3. Economie

### 1.3.1. Mines et industries

5,5% de la population travail dans ces secteurs et produit 41% du Produit National Brut (PNB).

L'exploitation minière concerne surtout le chrome, l'or, les pierres précieuses, le graphite et depuis peu l'ilménite.

Le secteur industriel malgache est dominé par les industries alimentaires (conserves de viandes, industries laitières, brasseries, raffinage du sucre) et par le raffinage du pétrole.

### **1.3.2. Energie**

Près de 64% (830,2 millions de kilowattheures par an) de l'énergie électrique du pays proviennent des diverses stations hydroélectriques.

### **1.3.3. Echanges**

La balance commerciale du pays est déficitaire car la valeur de l'importation (machines-outils, produits chimiques, pétrole brut, automobiles, produits métallurgiques) est supérieur à celle de l'exportation (dont 30% de la valeur provient du café).

### **1.3.4. Réseau de communication**

Madagascar dispose de 883km de voies ferrées en exploitation (1990) et de 49827km de route.

Le pays dispose aussi de nombreux ports (dont le plus important est Toamasina), de quatre grands aéroports (dont l'aéroport international d'Ivato) et d'autres aéroports plus petits.

### **1.3.5. Agriculture**

L'agriculture occupe moins de 10% de la superficie du pays. Les principales cultures sont : manioc, riz, haricots, patates douces, pommes de terre, café, girofle, canne à sucre, sisal, tabac, vanille et litchis.

### **1.3.6. Pêche**

La pêche nationale (que ce soit continental ou marine) est de 64000tonnes (2002). L'intégralité des langoustes et des crevettes va à l'exportation. Le pays exporte également des crevettes issues d'élevages.

### 1.3.7. Elevage

Madagascar se prête très bien à tout type d'élevage. A l'exception des autruches et des crocodiles, les animaux restent dans le circuit national depuis 1997 suite à un embargo de l'Union Européenne.

**Tableau III : Statistiques des animaux d'élevage terrestre à Madagascar pour l'année 2003**

<b>Province</b>	<b>Bovins</b>	<b>Porcins</b>	<b>Ovins</b>	<b>Caprins</b>	<b>Volailles</b>
Antsiranana	767 220	50 834	3 210	64 870	3 050 000
Mahajanga	2 280 900	81 823	5 098	141 638	3 430 000
Toamasina	503 320	72 027	7 420	200	6 076 000
Antananarivo	1 108 148	186 990	10 446	868	6 960 000
Fianarantsoa	1 117 226	168 679	12 824	2 004	5 470 000
Toliara	2 243 635	39 257	804 180	1 042 300	4 431 000
<b>Total</b>	<b>8 020 449</b>	<b>599 610</b>	<b>843 178</b>	<b>1 251 880</b>	<b>29 417 000</b>

Source : [18]

### 1.4. Importance de l'élevage aviaire à Madagascar

C'est dans la province d'Antananarivo qu'on trouve le plus d'oiseaux domestiques.

**Tableau IV : Répartition des volailles selon les provinces**

<b>Province</b>	<b>Pourcentage</b>
Antsiranana	10,37
Mahajanga	11,66
Toamasina	20,65
<b>Antananarivo</b>	<b>23,66</b>
Fianarantsoa	18,60
Toliara	15,06
<b>Total</b>	<b>100</b>

Source : [18]

### 1.4.1. Aviculture traditionnelle

Ce type d'élevage de volailles est commun à toutes les zones rurales du pays. Il s'agit d'un élevage peu développé et ne nécessitant aucune infrastructure particulière. Les animaux sont libérés la journée pour se nourrir de ce qu'ils peuvent trouver. Un petit complément de maïs et/ou de riz est donné occasionnellement.

C'est souvent les enfants qui s'occupent des animaux : les sortir le matin et les rentrer le soir.

Parce qu'il s'agit d'un élevage en divagation, il arrive que les oiseaux se fassent écraser par les voitures roulant à grande vitesse sur les routes nationales.

Les races locales utilisées sont des animaux rustiques, résistants à beaucoup de maladies mais très peu productifs. Néanmoins, cet élevage concerne 18 062 000 volailles soit 61,39% de l'effectif total.

Une fraction de la production est exportée vers les îles voisines et constitue donc une source de devises.

### 1.4.2. Aviculture moderne

Elle a connu un essor considérable ses dernières années avec l'apparition des fermes de petites et moyennes envergures. Bien que freinée par la maladie de Marek et le Gomboro, elle constitue, avec l'élevage traditionnel, une source de revenus et de protéines alimentaires importante. Elle se substitue à la porciculture qui a été décimée par la peste porcine africaine.

Sur les 11 355 000 volailles en aviculture moderne, il y a 10 472 490 (35,6% de l'effectif total) poulets de chair et 882 500 (3% de l'effectif total) poules pondeuses.

**Tableau V : Les souches utilisées en élevage moderne**

<b>Poulets de chair</b>	<b>Poules pondeuses</b>
Plymouth Rock, Sussex, Shaver Starbro, Shaver Redbro, Shaver Tropicbro, Arbor Acres	Rhode Island Red, Leghorn, Wyandotte, Shaver Starcross 579, Shaver Starcross 566, Shaver Starcross 577, Harco, Derco, Hissex

Source : [24]

**Tableau VI : Typologie des fermes d'élevage de poulets de chair**

<b>Effectif des poulets de chair</b>	<b>Pourcentage de fermes</b>
Inférieurs à 200 têtes	22%
200 à 1000 têtes	45%
Supérieur à 1000 têtes	33%

Source : [18]

**Tableau VII : Typologie des fermes d'élevage de poules pondeuses**

<b>Effectif des poules pondeuses</b>	<b>Pourcentage de fermes</b>
Inférieurs à 200 têtes	Très peu
200 à 1000 têtes	28%
Supérieur à 1000 têtes	72%

Source : [18]

### **1.4.3. Place de la volaille dans l'alimentation des malgaches**

La volaille est très appréciée des Malgaches. Elle se cuisine de diverses façons (rôti, frit, bouillie et accompagnée de sauce, pâté, saucisses...) mais préférée en grillade. C'est un aliment de rue très populaire et très apprécié. Le poulet est préalablement découpé avant d'être grillé tandis que le foie est transformé en brochette.

C'est aussi une source protéique très importante car elle sert à l'alimentation des enfants en bas âges et cela à la place des autres viandes qui coûtent relativement plus cher.

**Tableau VIII : Comparaison des prix de différentes sources protéiques vendues aux marchés d'Antananarivo**

<b>Aliments</b>	<b>Prix en FCFA par kilogramme</b>
Poulet de chair	800 à 1 000
Blancs et cuisses de poulet	1 200
Saucisses de poulet	900 à 1 200
Poulet traditionnel	1 200
Viande de bœuf avec os	1 000
Viande de bœuf sans os	1 200 à 1 300
Viande de porc	1 400 à 1 500

Saucisses (bœuf, porc)	1 200 à 1 500
Poissons d'eau douce frais	1 000 à 1 400
Fruits de mer congelés	1 000 à 2000
Poissons séchés	1 000 à 1 500

Source : enquête aux marchés d'Antananarivo

Les poulets sont particulièrement appréciés pour les fêtes religieuses et les cérémonies de mariage à Madagascar. De plus, il constitue souvent le repas dominical.

# CHAPITRE 2 : RAPPELS SUR LES PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES ETUDIÉES

## 2.1. Définition d'un antibiotique

Un antibiotique est une « substance chimique naturelle produite par un microorganisme qui, à faible concentration, a le pouvoir d'inhiber la croissance (effet bactériostatique) ou de détruire (effet bactéricide) certaines bactéries ou d'autres microorganismes » [12].

Selon cette définition, un antibiotique a une origine strictement naturelle. Il est issu des moisissures. Néanmoins, dans la pratique, on rencontre des produits semi synthétiques.

Les composés exclusivement artificiels tels que les sulfamides sont, quant à eux, regroupés sous le terme d'antibactériens de synthèse.

## 2.2. Classification

Il y a plusieurs façons de classer les antibiotiques. Il est possible de distinguer les différentes molécules en fonction :

- des familles : tétracyclines, nitrofuranes, aminosides, macrolides, sulfamides, bêta-lactamines,...
- des origines : naturelles et semi synthétiques (bêta-lactamines, macrolides, tétracyclines, aminosides), synthétiques (nitrofuranes, sulfamides) ;
- de leurs activités antibactériennes : les bactériostatiques (tétracyclines, macrolides, sulfamides), les bactéricides (bêta-lactamines, aminosides).

## 2.3. Bêta-lactamines

On désigne sous le nom de  $\beta$ -lactamines un ensemble d'antibiotiques antibactériens de très faible toxicité, d'origine naturelle ou semi synthétiques, caractérisés par la présence d'un noyau  **$\beta$ -lactame** (amide interne) et doués d'une activité antibiotique **bactéricide** sur les bactéries en phase de croissance.

Trois sous-groupes sont utilisés en médecine vétérinaire : les pénicillines, les céphalosporines et l'acide clavulanique.

### **2.3.1. Pharmacocinétique**

Les  $\beta$ -lactamines sont des acides forts et ont un caractère lipophile.

#### **2.3.1.1. Résorption**

La résorption orale est nulle pour la pénicilline G mais relativement bonne pour les autres antibiotiques de même famille. En revanche, elle est complète par la voie parentérale. Par injection, l'action est immédiate avec les solutions aqueuses de sels alcalins (sodium, potassium) et beaucoup plus lentes avec les sels de procaïne et de benzathine (on parle d'effet semi retard ou retard).

#### **2.3.1.2. Distribution**

La distribution est de type extracellulaire. Cet antibiotique est pratiquement ionisé dans sa totalité et se trouve donc sous forme hydrosoluble. Il diffuse alors principalement dans les tissus et organes les plus vascularisés (foie et reins).

Par contre, lors d'une méningite, les  $\beta$ -lactamines, sous sa forme non ionisée liposoluble, franchissent la barrière hémato-méningée pour être temporairement retenus par les protéines inflammatoires.

#### **2.3.1.3. Biotransformations**

Ces antibactériens subissent très peu de biotransformation car leur diffusion hépatique est faible.

#### **2.3.1.4. Elimination**

Ils seront éliminés par voie rénale par sécrétion tubulaire active. Ils ne subissent pratiquement pas de réabsorption tubulaire passive car ils sont entièrement ionisés au pH urinaire.

### **2.3.2. Activité antibactérienne**

Ils sont, en général, actifs sur les bactéries gram positif et négatif. Leur action se traduit par le blocage de la biosynthèse de la paroi bactérienne. Aussi, ces antibactériens sont bactéricides uniquement sur les germes en phase de multiplication.

### **2.3.3. Principales indications**

Ils sont particulièrement indiqués pour le traitement des septicémies, des infections broncho-pulmonaires et des infections urinaires.

## **2.4. Tétracyclines**

On désigne sous le nom de tétracyclines les antibactériens produits par des champignons inférieurs du genre *Streptomyces* et ses dérivés semi synthétiques. Ils sont caractérisés par la présence d'une structure tétracyclique issue du noyau naphtacène. Ils sont aussi doués d'une activité bactériostatique à spectre large sur les bactéries à Gram positif et négatif.

### **2.4.1. Pharmacocinétique**

Les tétracyclines utilisées en médecine vétérinaire sont en général lipophiles. Ce sont des bases faibles ayant une propriété chélatrice vis-à-vis du calcium.

#### **2.4.1.1. Résorption**

La résorption orale est incomplète car ces antibiotiques forment des chélates insolubles avec le calcium disponible au niveau de l'estomac (particulièrement avec celui du lait et de la viande).

La voie intramusculaire est douloureuse et incomplète pour la même raison car les tétracyclines (chélates) sont retenues au point d'injection. La voie intraveineuse est de ce fait souvent préférée.

#### **2.4.1.2. Distribution**

Du fait de leur liposolubilité, la distribution est à la fois extra et intracellulaire. La concentration sérique est voisine de la concentration tissulaire.

Diffusant en priorité vers les organes richement vascularisés (foie, poumons), ces antibactériens ont également une affinité pour les tissus osseux riches en calcium. Ils franchissent aussi la barrière placentaire.

#### **2.4.1.3. Biotransformations**

En raison de leur stabilité, les tétracyclines subissent très peu de biotransformations dans l'organisme. Celles-ci se limitent pratiquement à des conjugaisons.

#### **2.4.1.4. Elimination**

Cette famille d'antibiotiques s'élimine principalement sous forme inchangée par les urines, secondairement par la bile. La *doxycycline* s'élimine inversement essentiellement par voie biliaire après conjugaison. Les dérivés de conjugaison subissent un important cycle entérohépatique qui contribue à une demi-vie plasmatique prolongée.

#### **2.4.2. Activité antibactérienne**

Le spectre d'activité est large car il couvre à la fois les bactéries gram positif et négatif, les mycoplasmes, les leptospires, les rickettsies et, dans une certaine mesure, les amibes et les coccidies.

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques qui bloquent la biosynthèse des protéines bactériennes. Cette action résulte de leur fixation sur la sous-unité 30S des ribosomes par liaisons chélatées établies avec les groupes phosphates des ARN messagers. Elles empêchent ainsi la fixation des ARN de transfert sur l'ARN messager (interaction codon-anticodon).

#### **2.4.3. Principales indications**

Ils sont particulièrement indiqués pour le traitement des septicémies, des infections broncho-pulmonaires et des infections urinaires.

### **2.5. Sulfonamides ou sulfamides**

On désigne sous le nom de sulfonamides antibactériens un ensemble de composés organiques artificiels dérivés de la *sulfanilamide*. Ils sont caractérisés par une fonction sulfonamide ( $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ).

#### **2.5.1. Pharmacocinétique**

Elle est conditionnée par leur lipophilie et leur caractère acide faible.

##### **2.5.1.1. Résorption**

La résorption orale est habituellement rapide et complète. La voie parentérale donne un résultat satisfaisant. Ces molécules sont souvent mal tolérées localement. C'est pourquoi de nombreuses solutions sont uniquement employées par voie intraveineuse en perfusion.

### **2.5.1.2. Distribution**

La distribution des sulfonamides est de type extracellulaire comme celle de toutes les substances acides. Ils diffusent principalement dans les tissus et organes richement vascularisés.

Le degré de fixation sur les protéines plasmatiques est directement en relation avec la liposolubilité des dérivés. Les plus liposolubles, les dérivés méthoxylés, sont les plus fixés. Cette fixation joue un rôle de réservoir dans l'organisme et explique l'« effet retard » de ce type de sulfamides.

### **2.5.1.3. Biotransformations**

Dans le cas des sulfonamides les plus anciens, des acétylations de la fonction amine primaire aromatique conduisent à des métabolites nettement moins hydrosolubles que les composés parentaux. Cela peut avoir de graves conséquences toxicologiques.

Pour les sulfamides les plus récents, des hydroxylations des dérivés de substitution hétérocycliques, complétés de conjugaisons, conduisent à des métabolites hydrosolubles facilement éliminables.

### **2.5.1.4. Elimination**

Les sulfonamides s'éliminent principalement par sécrétion tubulaire active. Ce processus très intense permet d'atteindre dans les urines des concentrations actives très supérieures aux taux sériques.

Ces molécules sont en général éliminées dans les 24 heures qui suivent l'administration. Néanmoins, elles subissent une réabsorption tubulaire passive surtout dans les urines des carnivores.

## **2.5.2. Activité antibactérienne**

L'activité antibiotique est bactériostatique et s'exerce vis-à-vis des coccidies, des bactéries gram positif et négatif.

Les sulfonamides bloquent la biosynthèse des acides foliques, transporteurs d'unités mono carbonées indispensables à la synthèse des acides nucléiques. Cette action résulte d'une analogie structurale entre la molécule de sulfamide et l'acide para-amino-benzoïque (P.A.B.).

### **2.5.3. Principales indications**

Ces antibiotiques sont indiqués dans le traitement des septicémies, des infections broncho-pulmonaires, des panaris interdigités et des coccidioses.

## **2.6. Aminosides**

On désigne sous le nom d'aminocyclitols (ou aminosides) un ensemble d'antibiotiques antibactériens d'origine naturelle, ou semi synthétique, produit par des bactéries surtout du genre *Streptomyces*. A l'hydrolyse, ils libèrent un aminocyclitol (polyol cyclique aminé).

### **2.6.1. Pharmacocinétique**

Les aminosides sont hydrophiles et basiques.

#### **2.6.1.1. Résorption**

La résorption orale est pratiquement nulle. Aussi, par voie buccale, ces antibiotiques ne sont utilisables que pour des indications digestives et non générales.

La résorption parentérale des solutions aqueuses employées est en revanche rapide et complète.

#### **2.6.1.2. Distribution**

Du fait de leur très forte hydrosolubilité, ils se fixent très peu aux protéines plasmatiques (<10%). Ils ont donc une distribution extracellulaire.

Ils sont incapables de franchir les membranes biologiques et ne peuvent pas diffuser vers la mamelle ou l'utérus pour le traitement de ces infections localisées.

Toutefois, les aminocyclitols présentent une très forte affinité pour le tissu rénal et les cellules ciliées de l'oreille interne sur lesquels ils se fixent durablement. Ce tropisme rénal explique la néphrotoxicité et la toxicité auditive marquée de ces antibiotiques.

#### **2.6.1.3. Biotransformations**

Ils ne subissent, en raison de leur stabilité et de leur hydrosolubilité, pratiquement pas de biotransformations dans l'organisme.

#### **2.6.1.4. Elimination**

90% des aminosides sont rapidement éliminés de l'organisme, principalement en nature sous forme inchangée, par voie rénale. La fraction restante est piégée dans les cellules épithéliales des tubules proximaux du néphron et est lentement larguée (élimination prolongée habituellement sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines).

### **2.6.2. Activité antibactérienne**

Ils sont doués d'une activité antibiotique généralement bactéricide à spectre soit étroit surtout dirigé contre les bactéries à Gram négatif (*dihydrostreptomycine*) soit large contre les bactéries à Gram négatif et positif (*gentamicine*).

Ils gênent la biosynthèse des protéines bactériennes en empêchant surtout la phase d'initiation. Ils perturbent également la translation de l'ARN messager et provoquent ainsi une lecture incorrecte du code génétique par l'ARN de transfert. Ils entraînent donc la biosynthèse de « protéines non-sens » qui altèrent la perméabilité de la membrane bactérienne. Les aminosides provoquent par ailleurs la rupture des polysomes en monosomes incapables de réaliser la biosynthèse protéique. Enfin, ils bloquent la respiration bactérienne et l'initiation de l'ADN.

### **2.6.3. Principales indications**

Ils sont indiqués dans le traitement des septicémies, des infections broncho-pulmonaires, des infections urinaires et des infections à *Pseudomonas* (*gentamicine*).

## **2.7. Macrolides**

On désigne sous le nom de macrolides un ensemble d'antibiotiques d'origine naturelle produit par des micro-organismes du genre *Streptomyces* ou semi-synthétiques. Ils ont une structure hétérosidique libérant à l'hydrolyse une lactone (ou olide) macrocyclique.

### **2.7.1. Pharmacocinétique**

Le devenir de cette famille d'antibactériens dans l'organisme est conditionné par sa liposolubilité, sa stabilité et sa basicité.

#### **2.7.1.1. Résorption**

La résorption orale est en général rapide et complète. Il en est de même pour la voie parentérale.

#### **2.7.1.2. Distribution**

Lipophilie et faible basicité font que la distribution est intracellulaire (piégeage ionique intracellulaire). La concentration intracellulaire est cinq à dix fois supérieure à la concentration plasmatique. Ces antibiotiques diffusent parfaitement au travers des membranes biologiques vers les organes les plus vascularisés.

#### **2.7.1.3. Biotransformations**

Les macrolides subissent surtout des glucuroconjugaisons hépatiques.

#### **2.7.1.4. Elimination**

Les macrolides sont éliminés de l'organisme principalement par voie biliaire (80%) sous forme de conjugués. Ils subissent un cycle entérohépatique. Les 20% restants sont éliminés par voie rénale, salivaire et mammaire.

### **2.7.2. Activité bactérienne**

Ils sont doués d'une activité antibiotique bactériostatique à spectre étroit dirigé surtout contre les bactéries Gram positif, les pasteurelles et les mycoplasmes.

L'action antibactérienne des macrolides résulte de leur fixation sur la sous-unité 50S des ribosomes. Ils empêchent la translocation de l'ARN messager et ainsi l'allongement de la chaîne peptidique en formation.

Ils sont aussi à l'origine d'un effet post-antibiotique (bactériopause) important qui peut durer quelques heures. Après leur disparition du milieu de culture, ils continuent à exercer une activité antibactérienne. Ce phénomène est directement lié à leur accumulation à l'intérieur de la bactérie.

### **2.7.3. Principales indications**

Ils sont indiqués dans le traitement des infections broncho-pulmonaires (mycoplasmoses), infections mammaires streptococciques et staphylococciques, ainsi que des infections bucco-dentaires.

# **CHAPITRE 3 : RISQUES LIES A LA PRESENCE DE RESIDUS ANTIBIOTIQUES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (DAOA)**

## **3.1. Définitions**

### **3.1.1. Médicament vétérinaire**

Un médicament vétérinaire est toute substance appliquée ou administrée à tout animal producteur de nourriture, tels que les animaux producteurs de viande ou de lait, la volaille, les poissons ou les abeilles, que ce médicament soit utilisé dans un but thérapeutique, prophylactique ou de diagnostic, ou pour la modification de la fonction physiologique ou du comportement.

### **3.1.2. Résidus de médicaments antibactériens**

Les résidus de médicaments antibactériens font partie des résidus de médicaments vétérinaires qui comprennent les composés souches ou leurs métabolites ainsi que les impuretés associées au médicament vétérinaire concerné, présents dans toute partie comestible du produit animal (viande, lait, œuf, miel, chair de poisson, etc.).

### **3.1.3. Dose Journalière Admissible (DJA)**

La DJA est la quantité de médicaments vétérinaires, exprimée sur la base du poids corporel et pouvant être absorbée quotidiennement pendant toute la vie sans présenter de risque appréciable pour la santé (le poids humain normalisé est de 60kg).

### **3.1.4. Limite maximale de résidus pour les médicaments vétérinaires (LMRMV)**

C'est la concentration maximale de résidu résultant de l'emploi d'un médicament vétérinaire (exprimé en mg/kg ou µg/kg sur la base du poids frais) et recommandée par la commission du Codex Alimentarius comme légalement permise ou estimée acceptable dans ou sur un aliment.

Cette limite est basée sur le type et la quantité de résidu que l'on juge sans danger toxicologique pour la santé humaine tel qu'il est exprimé par la dose journalière admissible (DJA), ou sur la base d'une DJA temporaire utilisant un facteur supplémentaire de sécurité. Elle tient également compte d'autres risques de santé publique pertinents ainsi que de certains aspects technologiques alimentaires.

### **3.1.5. Temps de retrait, temps d'attente, délai d'attente**

Ces termes désignent le délai entre la dernière administration d'un médicament et le prélèvement de tissus ou produits comestibles sur un animal traité, garantissant que la teneur des résidus de médicament dans les aliments est conforme à la LMRMV.

## **3.2. Résidus d'antibiotiques**

### **3.2.1. Origine des résidus**

Les résidus sont des substances pouvant apparaître dans les denrées alimentaires par suite de l'utilisation de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires. Il s'agit de traces indésirables de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final [7]. Or, au cours de leur vie, les animaux doivent parfois être traités avec des médicaments destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies. Il arrive que des résidus de ces médicaments aboutissent dans des produits alimentaires provenant d'animaux producteurs d'aliments tels que bovins, porcins, volailles et poissons. Néanmoins, ces résidus ne doivent pas être nocifs pour les consommateurs. C'est la raison pour laquelle des limites maximales de résidus (LMR) sont fixées pour chaque type de médicaments vétérinaires. Dans certains cas, l'utilisation de la substance concernée peut être interdite.

### **3.2.2. Facteurs de persistance**

La persistance de résidus varie selon plusieurs facteurs :

- l'antibiotique lui-même ;
- la forme pharmaceutique ;
- les modalités d'injection ;
- le site d'injection ;
- la sévérité de l'irritation locale [7].

Il existe des différences notables sur ces points entre les différents antibiotiques.

### **3.3. Risques présentés par les résidus**

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

Les effets des résidus sur l'organisme humain dépendent de deux facteurs :

- de la transformation in vivo de la molécule d'origine, conduisant à la formation d'un métabolite ayant perdu ses propriétés antibactériennes mais possédant un pouvoir allergène résiduel. La toxicité de ce résidu peut être augmentée ou diminuée par rapport à celle de la molécule d'origine [7] ;
- de la « toxico disponibilité » qui correspond à la forme sous laquelle les résidus se trouvent dans l'organisme. Il peut être libre ou lié à des molécules [7].

#### **3.3.2. Réactions allergiques**

Plusieurs médicaments vétérinaires sont considérés comme ayant des effets allergènes. Deux familles d'antibiotiques sont souvent mises en cause : les bêta-lactamines et les macrolides [7]. En effet, les pénicillines constituent les composés les plus incriminés car des cas d'allergies dus à leurs résidus dans les aliments d'origine animale, notamment le lait, ont été scientifiquement prouvés. Peu de macrolides semblent entraîner des allergies.

L'effet des résidus est un effet déclanchant et non un effet sensibilisant. Il est vrai que compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotique administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu. D'autant plus que lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale, ils subissent donc des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène. Les résidus de pénicilline en particulier forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes. Ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessibles aux anticorps. Il est donc peu probable que des dérivés significativement immunogènes puissent être formés [7].

#### **3.3.3. Risques embryotoxiques et tératogènes**

Chez l'homme, il y a différentes causes de malformations :

- mutations génétiques : 20% ;

- produits chimiques : 4 à 6% ;
- aberrations chromosomiques : 3 à 5% ;
- infections : 2 à 3% ;
- déséquilibres métaboliques : 1 à 2% ;
- radiations : moins de 1% ;
- inconnues : 65 à 70%.

L'existence des risques embryotoxiques et tératogènes avec les résidus de médicaments vétérinaires est controversée. Cependant, s'ils existent, ils devraient être doses dépendantes.

### **3.3.4. Foetotoxicité**

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

### **3.3.5. Risques cancérogènes**

La cancérogenèse se déroule en deux phases complémentaires :

- l'*initiation* qui est une modification irréversible de l'information génétique ;
- la *promotion* qui permet à l'initiation de s'exprimer sous forme de tumeur.

La première phase est *non dose dépendante* tandis que la deuxième est *dose dépendante*.

### **3.3.6. Risques pour l'industrie agro-alimentaire**

Il s'agit principalement de l'industrie laitière où les résidus d'antibiotiques perturbent les fermentations. Ces accidents interviennent surtout dans la fabrication des yaourts et des fromages affinés par inhibition des ferments lactiques et sélection de souches indésirables (staphylocoques). Le niveau de ces perturbations est variable selon la nature des antibiotiques, la concentration dans le lait et le type de produit fabriqué mais les pertes économiques qui s'en suivent peuvent être importantes (risque de détérioration des produits).

### **3.3.7. Risques pour les contrôles bactériologiques**

La présence de résidus d'antibiotiques dans des denrées alimentaires soumises à un contrôle de qualité bactériologique peut amener à des résultats erronés. En effet, ces résidus suffisent à inhiber la croissance des microorganismes en culture. Les conséquences peuvent être graves du fait d'un éventuel masquage de la présence de germes pathogènes par inhibition due à ces résidus.

### **3.3.8. Risques de résistances aux antibiotiques**

#### **3.3.8.1. Acquisition des résistances**

Le facteur le plus important dans la sélection de bactéries résistantes est généralement admis comme étant l'usage d'antibiotique [7]. Cependant, il est impossible de faire la différence entre une antibiorésistance induite par les médicaments (ou résidus) vétérinaires d'une autre due à la médication chez l'homme. De plus, il faut noter la place de l'antibiosupplémentation (utilisation d'antibiotiques à très faible dose dans l'alimentation animale). Ces antibactériens promoteurs de croissance sont analogues à ceux utilisés en médecine humaine et comportent des résistances croisées avec eux. Les animaux qui les consomment rejettent donc une grande quantité de bactéries résistantes dans leurs fèces. Ces germes sont alors transférés aux hommes par voie directe ou indirecte via les aliments d'origine animale. Ils colonisent ainsi directement le tube digestif de l'homme ou échangent leurs gènes de résistance avec des bactéries commensales de l'intestin [7].

Il est évident que les souches résistantes se transmettent aussi de l'homme à l'animal. Un phénomène d'amplification peut alors se produire chez les animaux. Les bactéries résistantes diffusent dans l'environnement par les fèces. Ceci conduit à la contamination de l'eau, des aliments pour les animaux, des cultures, et dans le cas des ruminants, à une contamination par le biais des pâturages.

#### **3.3.8.2. Cas des souches multi résistantes**

De nombreux antibiotiques sont de plus en plus inefficace suite à l'apparition de souches bactériennes multi résistantes. Le tableau ci-dessous provient de la coproculture des selles d'un bébé sénégalais.

**Tableau IX : Antibiogramme d'*Escherichia coli* (septembre 2006)**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Sensibilité du germe</b>
Amoxicilline	<b><i>Résistance</i></b>
Augmentin	<b><i>Résistance</i></b>
Chloramphénicol	Sensible
Erythromycine	<i>Intermédiaire</i>
Pefloxacine	Sensible
Céphalotine	<i>Intermédiaire</i>
Colistine	<i>Intermédiaire</i>
Gentamicine	Sensible
Oxacilline	<b><i>Résistance</i></b>
Ampicilline	<b><i>Résistance</i></b>
Doxycycline	<b><i>Résistance</i></b>
Céfotaxime	Sensible
Sulfamethoxazole	<b><i>Résistance</i></b>
Triméthoprine	<i>Intermédiaire</i>

Source : enquête au Sénégal

La multi résistance risque de compromettre gravement l'efficacité des antibiothérapies entreprises en médecine humaine basées sur les mêmes principes actifs que ceux utilisés en élevage et donc en médecine vétérinaire [11].

### **3.3.9. Autres risques**

Les résidus entraînent une modification de la flore intestinale humaine [23]. Le déséquilibre provient d'une inhibition ou d'une destruction de certaines souches. Autre risque est l'apparition d'anémie aplasique chez l'homme. Cette aplasie est irréversible avec le chloramphénicol. Cet effet secondaire a été mis en évidence non seulement lors de traitements systémiques mais aussi lors d'application locale et même lors d'exposition professionnelle [7].

# **DEUXIEME PARTIE :**

# **ETUDE EXPERIMENTALE**



# CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODE

## 1.1. Matériel

### 1.1.1. Produits analysés

L'étude porte uniquement sur les produits issus des poulets de chair et des volailles élevées de manière traditionnelle. Un total de 128 échantillons a été prélevé dont 57 chairs de poulets et 71 foies.

### 1.1.2. Matériel de prélèvement

Il s'agit de :

- pinces et couteaux stériles ;
- de sacs plastiques stériles ;
- glacières et plaques eutectiques ;
- voiture.

### 1.1.3. Matériel de laboratoire

Ce sont des matériels généralement trouvés dans les laboratoires de microbiologie.

**Tableau X : Matériel utilisé**

Matériel de conservation	Réfrigérateur et congélateur
Matériel de stérilisation	Autoclave, four Pasteur, bec bunsen
Matériel de préparation des milieux et des solutions témoins	Balance de précision (0.1mg), spatule, distillateur, ph-mètre, distributeur répartiteur semi-automatique
Matériel de préparation des échantillons	Emporte-pièce d'un diamètre de 8mm, affiloir (pour affûter l'emporte-pièce), bistouri, plateaux en acier inoxydable, hotte à flux laminaire horizontal.
Matériel de diffusion	Pipettes automatiques (type EPPENDORF), cônes, pinces brucelles à bouts pointus, disques de papier filtre (type DURIEUX)

Matériel pour ensemencement et repiquage	Agitateur électrique (VORTEX), anse bouclée en platine
Matériel d'incubation	Etuves
Verrerie	Flacons, boîtes de pétri, pipettes pasteurs, tubes à essai, boîtes de Roux, billes de verre, ballons, béchers,...

#### 1.1.4. Milieux de culture

Il s'agit surtout de :

- gélose tryptone soja (GTS) ;
- test agar de pH 6 ;
- test agar de pH 7,4 ;
- test agar de pH 8 ;
- bouillon de culture.

#### 1.1.5. Microorganismes sensibles

**Tableau XI : Microorganismes utilisés pour le test**

Microorganisme-test	Forme
<i>Bacillus subtilis</i> BGA	suspension
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	lyophilisée

### 1.2. Méthode

La méthode utilisée est de référence LMR/90/01-rév 2. Elle est couramment appelée « méthode des quatre boîtes » ou encore « méthode des quatre plaques » par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) [2].

#### 1.2.1. Objet et domaine d'application

La détection des résidus à activité antibiotique a pour objet, à l'aide des microorganismes sensibles, la mise en évidence de ces résidus sans en déterminer

leur identité précise. C'est une méthode applicable aux muscles et foies d'animaux de boucherie, de volailles et de palmipèdes gras. Elle n'est pas applicable aux reins.

### **1.2.2. Principe**

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

- l'ensemencement, par un microorganisme sensible aux substances à activité antibactérienne, d'un milieu nutritif solide coulé en boîte de Pétri ;
- le dépôt, à la surface du milieu ensemencé, d'une rondelle de chair (muscle, foie) congelée suivi d'une incubation à la température optimale de développement du microorganisme-test.

Les substances à activité antibactérienne éventuellement présentes inhibent la croissance du microorganisme-test : il en résulte la formation d'une zone d'inhibition autour de l'échantillon (illustration en ANNEXE 3).

### **1.2.3. Préparation des microorganismes sensibles**

La préparation de l'inoculum est un facteur critique pour l'exactitude et la précision des tests de diffusion en gélose. Il est par conséquent capital d'employer une technique qui donnera une suspension reproductible et un nombre correct de germes [22].

#### **1.2.3.1. Préparation de *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* est un germe ubiquiste et tellurique qui appartient à la famille des Bacillaceae [28]. Sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C.

La souche utilisée pour cette étude est *Bacillus subtilis* BGA commercialisée sous forme d'ampoule de suspension de  $8.10^6$  à  $5.10^7$  spores/ml. Cette dernière est directement utilisable après dénombrement des spores. Si nécessaire, elle peut aussi servir à préparer d'autres lots de spores.

#### **1.2.3.2. Préparation de *Micrococcus luteus***

*Micrococcus luteus* est une bactérie appartenant à la famille des Micrococcaceae. Ce germe peut se trouver dans la poussière, le sol, l'eau et les aliments. Il est aussi rencontré sur la peau et les muqueuses des hommes et des animaux [28]. Sa

température optimale de croissance se situe entre 25 et 37°C [26]. La souche utilisée pour cette étude est lyophilisée.

#### Préparation des semences longues conservation (S.L.C.)

La culture lyophilisée est réhydratée avec 2ml d'eau physiologique. Afin d'isoler et confirmer l'identité de ces germes, deux boîtes de GTS sontensemencées en stries avec cette suspension. Après au moins 24 heures d'incubation à 37°C, les boîtes sont lues.

Plusieurs tubes de bouillon de culture sont ensuiteensemencés par quelques colonies prélevées sur une des boîtes. Ces tubes sont incubés à 37°C pendant 3 à 6 heures. A l'issue de l'incubation, la culture est répartie par fractions de 0,5 à 1ml dans des micro tubes operculés ou tubes de nunc. Skim milk et cryobilles ont été aussi utilisés pour la conservation. La conservation est faite à une température inférieure ou égale à -18°C pendant 18 jours maximum.

#### Préparation du lot de semence d'essai (S.E.)

Trois repiquages successifs sur pentes de GTS ont été effectués à partir d'un lot de S.L.C. pour la remise en activité de la souche. En parallèle, deux boîtes de GTS sontensemencées en stries pour isolement et confirmation d'identification. Les incubations sont effectuées à 37°C pendant au moins 24 heures.

Par la suite, avec une dizaine de billes de verre et 2ml d'eau physiologique, une culture datant de moins de 24heures est récoltée sous forme de suspension. Cette dernière est répartie à la surface de 200ml de GTS préalablement coulée en boîte de Roux. Cette boîte est incubée à 37°C pendant au moins 24 heures. La culture est récoltée à l'aide d'une vingtaine de billes de verre et de 10ml d'eau physiologique, puis elle est complétée ou ajustée à 50ml dans un flacon.

Cette suspension de germes est conservée au réfrigérateur pendant un mois maximum.

#### **1.2.4. Numération**

La numération sert à déterminer la concentration en spores. La suspension est diluée dans l'eau physiologique. En effet, il faut faire diverses dilutions (jusqu'à 10<sup>-10</sup> pour les lots préparés). Pour chaque dilution, deux fois 100µl sont alors prélevés et

ensemencés dans deux boîtes de gélose tryptone soja (GTS). Après 24 à 48h d'incubation à 30°C, les colonies sont comptées.

### 1.2.5. Préparation des boîtes de pétri

Trois types de milieu sont ensemencés avec les spores de *Bacillus subtilis* :

- *Milieu gélosé à pH 6 (premières boîtes d'essai)*

Le milieu gélosé test agar à pH 6 préalablement fondu puis refroidi à 45°C est ensemencé avec une dilution de la suspension de *Bacillus subtilis* de façon à obtenir une concentration d'environ  $5 \cdot 10^4$  spores par millilitre de milieu.

Le milieu de culture ensemencé est réparti dans des boîtes de pétri à raison de 5ml par boîte. Le refroidissement se fait sur une surface froide et plane. Les plaques ainsi préparées, si elles ne sont pas utilisées le jour même, sont conservées au réfrigérateur pendant trois jours au maximum.

- *Milieu gélosé à pH 7,4*

Le mode opératoire est identique aux premières boîtes d'essai. La différence est que le test agar utilisé est de pH 7,4. De plus, une solution de triméthoprime à la concentration de 1% (v/v) est ajoutée au milieu après ensemencement. L'addition de cette molécule améliore la détection des sulfamides grâce à la synergie triméthoprime-sulfamides.

- *Milieu gélosé à pH 8*

Le technique est la même que celle des premières boîtes d'essai mais c'est le milieu gélosé qui change en test agar de pH 8.

Un autre type de milieu gélosé à pH 8 est aussi ensemencé de manière identique aux premières boîtes d'essai mais avec des suspensions de *Micrococcus luteus*.

### 1.2.6. Préparation des échantillons

#### 1.2.6.1. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements ont été faits de manière à répondre à trois soucis :

- le souci statistique de faire un prélèvement aussi représentatif que possible de la denrée étudiée ;
- le souci biochimique de ne pas modifier la concentration en résidus de la denrée ;

- et le souci bactériologique de ne pas apporter d'autres microorganismes étrangers à ceux utilisés pour l'analyse (asepsie des prélèvements, exclusion des poulets vivants).

Un poids minimum de 30g a été respecté pour chaque prélèvement (poids unitaire du foie). Les échantillons ont été prélevés entre 8 et 11 heures du matin avec des matériels stériles provenant du laboratoire (couteaux, pinces)

#### **1.2.6.2. Conditionnement et transport des échantillons**

Chaque échantillon a été conditionné de façon unitaire dans un sachet stérile délicatement fermé et étiqueté. Chaque étiquette mentionne le code de l'échantillon, la date, l'heure et le lieu de prélèvement. Les produits ainsi prélevés sont placés et transportés dans une glacière munie de plaques eutectiques. Ils sont acheminés le plus rapidement possible au laboratoire pour être congelés. Après congélation, les échantillons sont immédiatement analysés. La durée totale s'écoulant entre le prélèvement et l'analyse ne dépassant jamais cinq heures.

#### **1.2.6.3. Traitement des échantillons**

Quelques minutes avant l'utilisation, les échantillons sont sortis du congélateur et sont déposés sur un plateau en acier inoxydable. Une carotte cylindrique de 8mm de diamètre et de 2cm de long environ est prélevée sur chaque échantillon à l'aide d'un emporte-pièce. Tout en poussant le cylindre de muscle hors de l'emporte pièce, huit (8) rondelles de 2mm d'épaisseur sont découpées à l'aide d'un bistouri (illustration en annexe 4).

Deux rondelles sont placées, en position diamétralement opposée, sur chacune des quatre boîtes d'essai à l'aide de pinces. Il est ainsi possible de déposer dans chacune de ces boîtes jusqu'à six rondelles, correspondant à trois échantillons à examiner, suivant un cercle à environ 1cm de la périphérie de la boîte.

#### **1.2.7. Technique de diffusion**

##### *Bacillus subtilis à pH 6*

Un disque de papier filtre est déposé au centre de la boîte d'essai à l'aide d'une pince. 10µl d'une solution témoin contenant de la **pénicilline** est déposée sur ce disque. La boîte ainsi préparée est placée dans une étuve à 30±1°C, pendant au moins 18heures. A l'issue de l'incubation, le disque imprégné de la solution témoin

(0,002U.I de pénicilline), doit présenter une zone d'inhibition, dont la taille de la zone annulaire doit être de  $6 \pm 1$ mm. La zone annulaire est la distance comprise entre le bord du disque et la limite externe de la zone d'inhibition.

#### Bacillus subtilis à pH 7,4

La technique est identique à celle décrite précédemment mais, au lieu de la pénicilline, la solution témoin est constituée de 10 $\mu$ l de **sulfadimérazine** (0,2 $\mu$ g).

#### Bacillus subtilis à pH 8

Même technique que ci-dessus mais le témoin est une solution de **dihydrostreptomycine** (10 $\mu$ l, soit 0,05 $\mu$ g).

#### Micrococcus luteus à pH8

Méthode semblable à celle décrite précédemment mais le témoin est constitué de 10 $\mu$ l de la solution contenant de l'**érythromycine**. La boîte ainsi préparée est placée dans une étuve à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant au moins 24heures. A l'issue de l'incubation, le disque imprégné de la solution témoin (0,0025 $\mu$ g d'érythromycine) doit présenter une zone d'inhibition dont la taille de la zone annulaire doit être de  $4 \pm 1$ mm.

### **1.2.8. Exploitation des résultats**

Pour chacune des quatre boîtes, sont considérés comme positifs, les échantillons donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins égale à 2mm. L'essai est recommencé à chaque fois que le résultat semble douteux (pour un même échantillon une rondelle étant positive et l'autre négative, colonies éparses dans la zone d'inhibition, contaminations, etc...). Si le second résultat n'est pas considéré comme positif, le résultat douteux doit être considéré comme négatif.

Les résultats positifs sont subdivisés en trois catégories :

- **+** : si la taille de la zone annulaire est égale à 2mm.
- **++** : si la taille de la zone annulaire est comprise entre 2mm et inférieure ou égale à 4mm.
- **+++** : si la taille de la zone annulaire est supérieure à 4mm.

### **1.2.9. Méthodes d'interprétation**

#### *Bacillus subtilis* à pH 6 :

La première boîte d'essai permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des **bêta-lactamines** et/ou des **tétracyclines**.

#### *Bacillus subtilis* à pH 7,4

La deuxième boîte d'essai permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des **sulfamides**.

#### *Bacillus subtilis* à pH 8

La troisième boîte d'essai permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des **aminosides**.

#### *Micrococcus luteus* à pH8

La quatrième boîte d'essai permet de détecter plus particulièrement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des **bêta-lactamines** et/ou des **macrolides**.

Les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des quatre techniques de diffusion en gélose sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique.

## CHAPITRE 2 : RESULTATS

### ***2.1. Présence de résidus au niveau des carcasses et abats de volailles vendus dans la capitale***

L'étude montre que sur les 128 échantillons analysés, 47 sont contaminés par des résidus d'antibiotiques. Le taux de contamination global est donc de 36,72%.

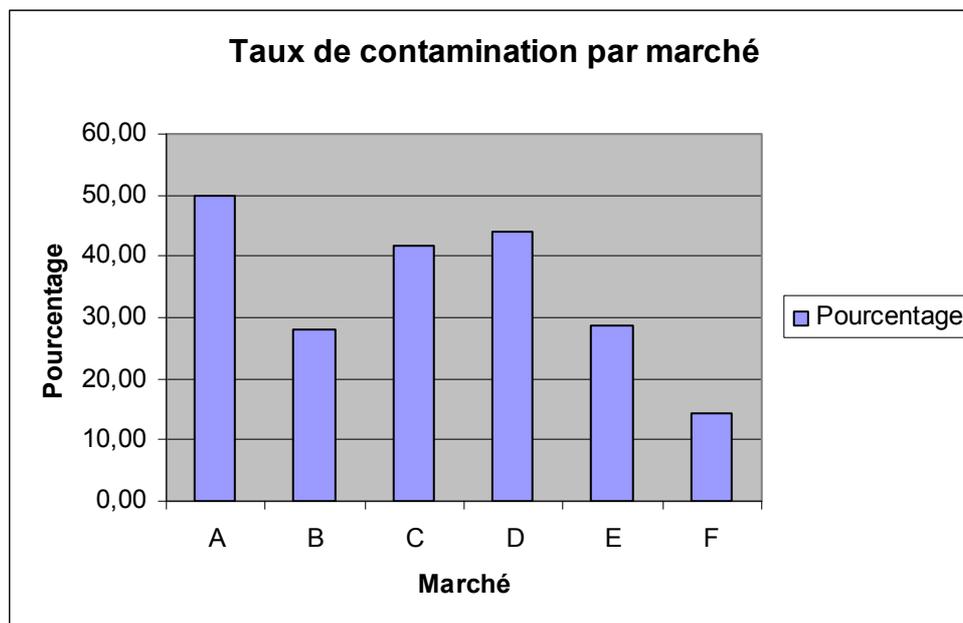
Il y a des prélèvements positifs à plusieurs résidus. Néanmoins, ce sont les aminosides qui sont les plus impliquées dans cette contamination. En effet, sur les 47 cas de positivité, 42 contiennent des résidus d'aminosides, 19 de bêta-lactamines et/ou tétracyclines, 19 de sulfamides et 20 de bêta-lactamines et/ou macrolides.

### ***2.2. Etude comparative du taux de contamination au niveau de chaque marché***

**Tableau XII : Taux de contamination par marché (en pourcentage)**

<b>Marché</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>A</b>	50,00
<b>B</b>	28,00
<b>C</b>	41,67
<b>D</b>	44,00
<b>E (Supermarché)</b>	28,57
<b>F (Supermarché)</b>	14,29

**Figure 2 : Taux de contamination par marché (en pourcentage)**



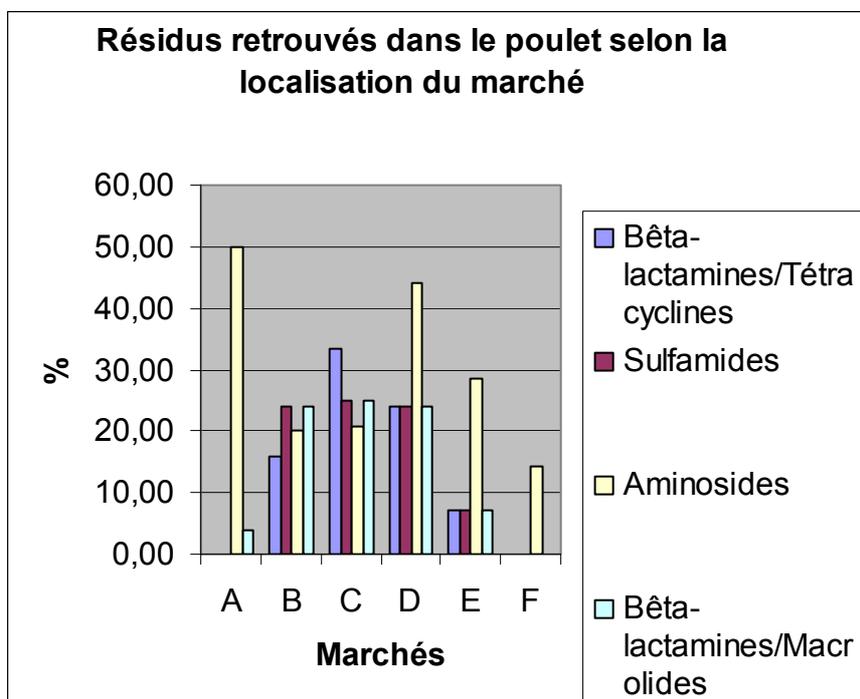
Ce résultat montre que le taux de positivité varie d'un marché à l'autre. Jusqu'à la moitié des échantillons prélevés au niveau du marché A sont contaminés ; tandis que pour le marché F, la contamination n'est que de 14,29%. En général, le risque de résidu est supérieur à 28%.

### ***2.3. Familles d'antibiotiques incriminées dans la contamination au niveau de chaque marché***

**Tableau XIII : Comparaison des contaminants à l'intérieur des différents marchés (en pourcentage)**

Marché	Bêta-lactamines/Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bêta-lactamines/Macrolides
<b>A</b>	0,00	0,00	50,00	3,84
<b>B</b>	16,00	24,00	20,00	24,00
<b>C</b>	33,33	25,00	20,83	25,00
<b>D</b>	24,00	24,00	44,00	24,00
<b>E</b>	7,14	7,14	28,57	7,14
<b>F</b>	0,00	0,00	14,28	0,00

**Figure 3 : Comparaison des contaminants à l'intérieur des différents marchés (en pourcentage)**



Ce résultat confirme la place que tiennent les résidus d'aminositides qui sont retrouvés au niveau de tous les marchés. Ils constituent le principal contaminant et, parfois même le seul.

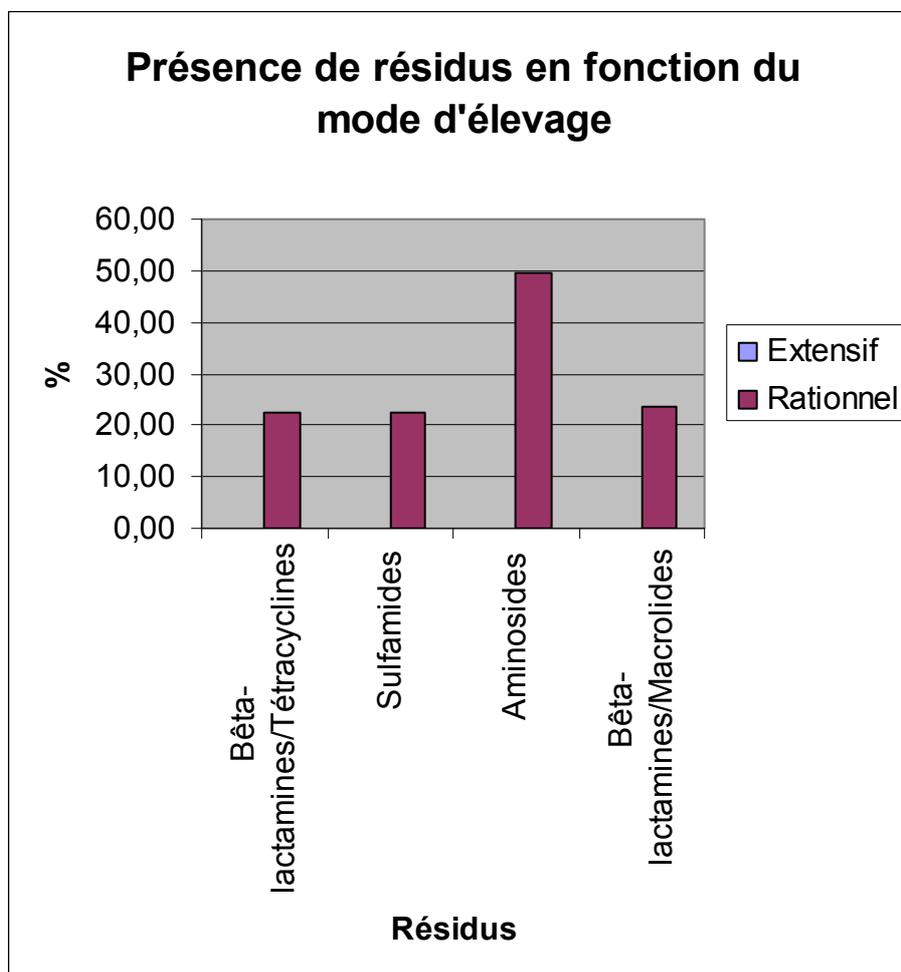
D'autres résidus d'antibiotiques (bêta-lactamines, tétracyclines, sulfamides et macrolides) sont présents sur les deux tiers (2/3) des marchés.

#### **2.4. Impact du mode d'élevage dans le risque de présence de résidus d'antibiotiques chez la volaille**

**Tableau XIV : Comparaison des contaminations en fonction du mode d'élevage (en pourcentage)**

Mode d'élevage	Bêta-lactamines/Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bêta-lactamines/Macrolides
Extensif	0,00	0,00	0,00	0,00
Rationnel	22,35	22,35	49,41	23,52

**Figure 4 : Comparaison des contaminations en fonction du mode d'élevage (en pourcentage)**



L'étude montre qu'il n'y a pas de cas de positivité au niveau de l'élevage traditionnel. Par contre, les seuls résultats positifs provenaient tous de l'élevage rationnel (moderne).

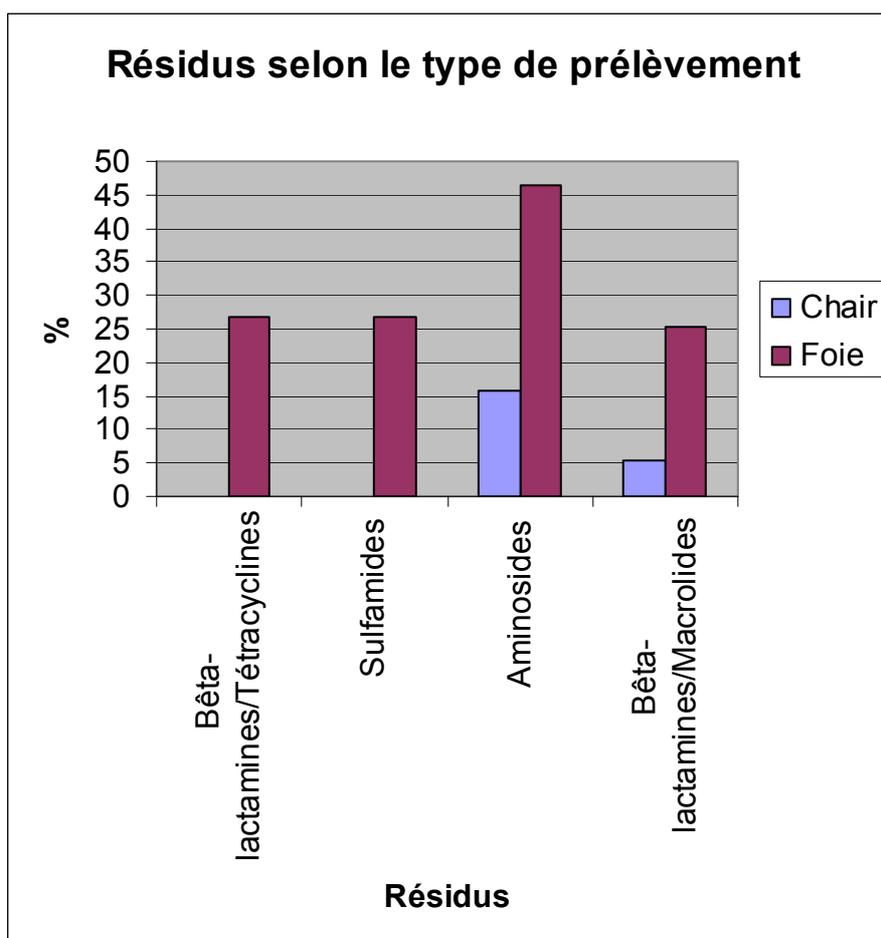
La famille d'antibiotiques la plus incriminée reste les aminosides. Les autres antibactériens sont concernés à des niveaux plus ou moins identiques.

## 2.5. Variation du risque selon le produit de consommation acheté (chair ou foie)

Tableau XV : Comparaison des contaminations en fonction du prélèvement (en pourcentage)

Prélèvement	Bêta-lactamines/Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bêta-lactamines/Macrolides
Chair	0	0	15,78	5,50
Foie	26,76	26,76	46,47	25,35

Figure 5 : Comparaison des contaminations en fonction du prélèvement (en pourcentage)



Les résidus sont présents aussi bien dans la chair de poulet que dans le foie. Néanmoins, le taux de contamination est plus élevé pour ce dernier.

Une autre différence est que tous les types de résidus se rencontrent au niveau du foie. A l'opposé, le muscle est uniquement contaminé par les bêta-lactamines/macrolides et les aminosides.

Dans les deux cas, ce sont les aminosides qui sont les plus incriminées.

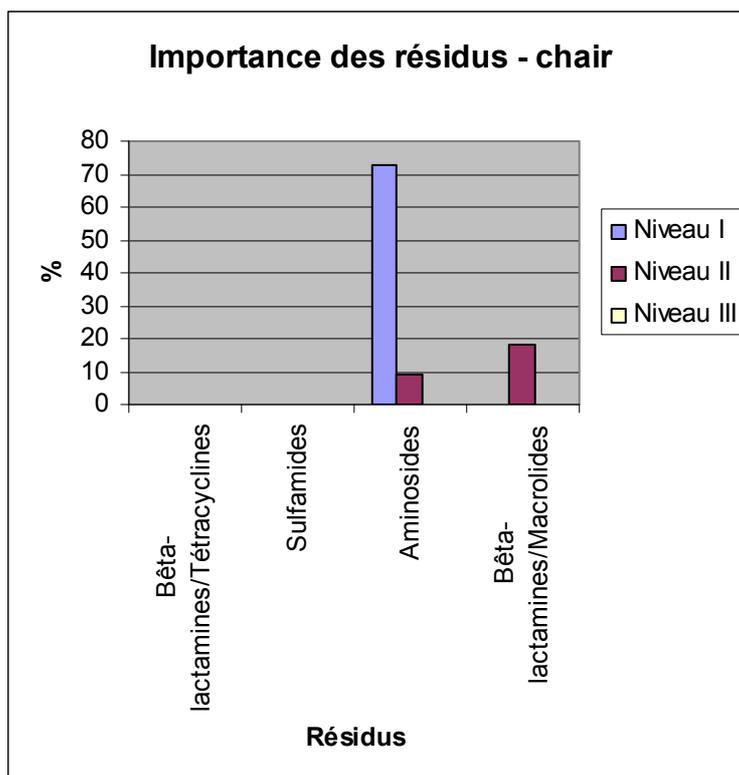
## 2.6. Niveau de contamination selon le type de DAOA

### 2.6.1. Niveau de contamination de la chair de poulet

**Tableau XVI : Niveau de contamination de la chair de poulet (en pourcentage)**

Niveau de contamination	Bêta-lactamines/Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bêta-lactamines/Macrolides
2mm	0	0	72,72	0
2 à 4mm	0	0	9,09	18,18
4mm et plus	0	0	0	0

**Figure 6 : Niveau de contamination de la chair de poulet (en pourcentage)**



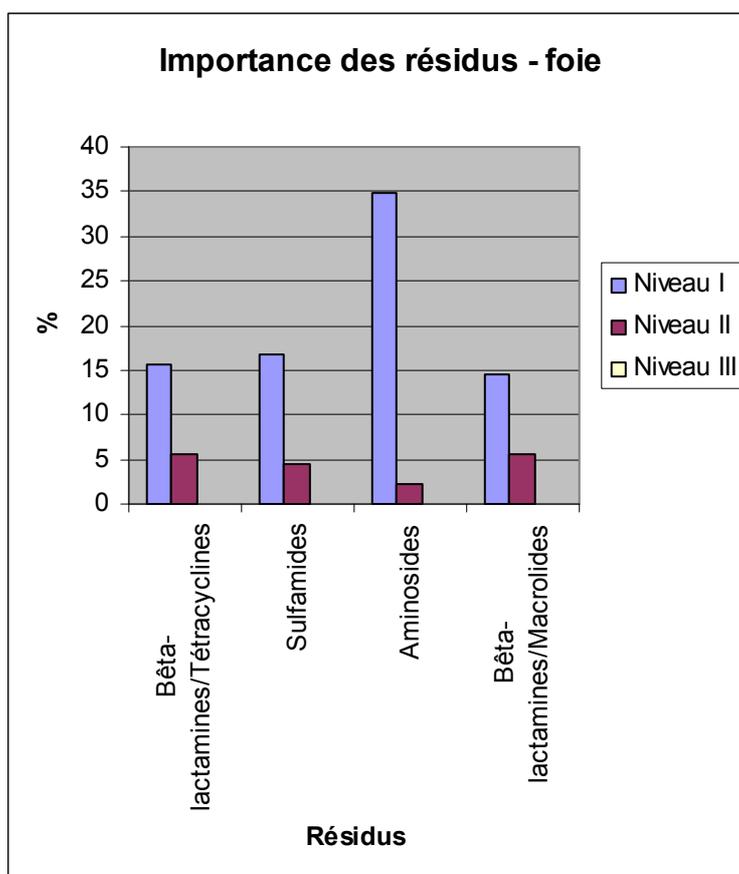
Les résidus les plus impliqués au niveau de chair sont ceux des aminosides. Ils sont en général en doses très faibles car leurs zones d'inhibition sont souvent égales à 2mm. Les bêta-lactames / macrolides sont assez peu fréquentes mais en dose plus élevées (zone d'inhibition de 2 à 4mm).

### 2.6.2. Niveau de contamination du foie de poulet

**Tableau XVII : Niveau de contamination du foie de poulet (en pourcentage)**

Niveau de contamination	Bêta-lactamines/Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bêta-lactamines/Macrolides
2mm	15,73	16,85	34,83	14,6
2 à 4mm	5,61	4,49	2,24	5,61
4mm et plus	0	0	0	0

**Figure 7 : Niveau de contamination du foie de poulet (en pourcentage)**



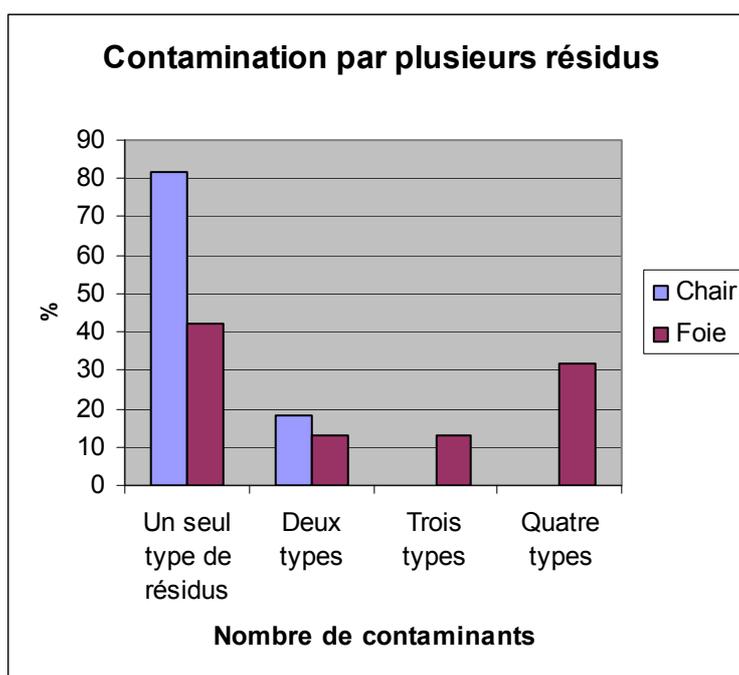
Tout comme pour la chair, le foie est plus contaminé par des résidus à très faible dose car leurs zones d'inhibition sont égales à 2mm pour la plupart. Dans de rares cas, les résidus sont plus importants (2 à 4mm).

## 2.7. Contamination multiple

**Tableau XVIII : Contamination par un ou plusieurs types de résidus (en pourcentage)**

Prélèvement	Un seul type de résidus	Deux types	Trois types	Quatre types
Chair	81,81	18,18	0	0
Foie	42,1	13,15	13,15	31,57

**Figure 8 : Contamination par un ou plusieurs types de résidus (en pourcentage)**



Le foie est majoritairement contaminé par un seul ou quatre type de résidus à la fois. Le muscle contient généralement un seul type de résidu.

## **CHAPITRE 3 : DISCUSSIONS ET RECOMMANDATIONS**

### **3.1. Discussions**

#### **3.1.1. Discussions relatives à la méthode d'analyse**

##### **3.1.1.1. Choix de la méthode**

Le choix a été dicté par des contraintes financières et matérielles. En effet, il nous fallait mettre en œuvre une méthode simple, abordable, d'exécution relativement rapide et précise. Les matériels nécessités par la méthode des quatre plaques, à la différence des autres méthodes, étaient plus faciles à acquérir.

##### **3.1.1.2. Avantages de la méthode**

C'est une méthode d'orientation qui est sensible et nécessitant peu de moyen (matériel de laboratoire classique et réactifs peu coûteux). Les souches utilisées pour les tests sont sensibles vis-à-vis des familles d'antibiotiques testées [3].

##### **3.1.1.3. Inconvénients de la méthode**

C'est une méthode non spécifique car elle ne permet ni l'identification précise ni le dosage du résidu d'antibiotique. De plus, sa sensibilité peut conduire à de faux résultats.

L'hygiène des prélèvements et leur conservation adéquate conditionnent une bonne lecture des résultats et donc leurs interprétations.

Enfin, il faut ajouter que la technique nécessite le dépôt sur la gélose de rondelles de muscles (ou de foies) congelés. Or, l'incubation se déroulant à 30 ou 37°C, la variation de température entraîne la formation d'une couche de liquide devenant compacte autour des rondelles. Cette dernière gêne la lecture et rend donc l'interprétation difficile (illustration en ANNEXE 3). Des frottis réalisés à partir de cette couche ont montrés dans certains cas des bactéries [3].

##### **3.1.1.4. Limites de l'étude**

Les antibactériens ont des structures trop différentes pour être analysés par une seule méthode. De plus, les méthodes doivent être quantitatives car la teneur en résidus (LMR) est réglementée [11]. Selon DIOP [10], une étude complète des résidus nécessite plusieurs étapes avec des moyens assez lourds :

- le dépistage qui fait appel à des méthodes microbiologiques : c'est le cas de la méthode des quatre plaques ;
- l'identification et le dosage font appel à une analyse spécifique quantitative qui se fait par des méthodes immunologiques et polarographiques (ELISA, RIA) [3;11] ;
- la confirmation fait appel à une analyse avec des méthodes chromatographiques (*High Performance Liquid Chromatography* et *Chromatographie en phase gazeuse*) si deux analyses spécifiques quantitatives faites sur un même échantillon révèlent une quantité de résidus supérieure aux LMR.

Notre étude s'étant arrêtée au dépistage, nos résultats ne représentent donc pas le taux réel de contamination. Néanmoins, ils représentent le taux maximum que celle-ci pourrait avoir s'il n'y a pas de faux positifs dans le lot. De plus, il nous est impossible de dire la molécule qui est précisément impliquée car le test utilisé est un test d'orientation qui devait aboutir à des recherches plus poussées. Enfin, La méthode des quatre plaques ne nous permet pas de quantifier la teneur exacte en résidu. Cependant, le seuil de 2mm de zone d'inhibition correspond à une concentration supposée égale à la LMR.

Il faut également ajouter qu'il est très difficile d'obtenir des prélèvements stériles ou pauci microbiens car les poulets sont en général vendus sur une table à l'air libre. De plus, les vendeurs et certains clients manipulent ces denrées à la main.

### **3.1.2. Discussion sur l'échantillonnage, le nombre et la nature des prélèvements**

Pour l'étude, deux chaînes de supermarchés et quatre grands marchés ont été ciblés.

Les prélèvements ont été effectués de façon aléatoire au niveau de ces marchés. Néanmoins, le nombre d'échantillons par marché est relativement proportionnel à la dimension des surfaces de ventes. Il faut préciser que les marchés se fournissent auprès de toutes les fermes même celles qui sont clandestines. A l'opposée, les supermarchés s'approvisionnent uniquement auprès de deux ou trois grosses fermes. L'étude ne tient pas compte du volume de vente hebdomadaire.

Pour améliorer la représentativité de l'échantillon, il nous fallait augmenter le nombre de marchés et de prélèvements au niveau de chacun d'eux. C'était le budget pour l'étude qui nous a limité.

Les prélèvements de muscles sont assez variables : blancs de poulets, cuisses et dans de rares cas les ailes. Malgré le risque d'avoir des faux positifs, le foie a été accepté comme échantillon car c'est une denrée couramment consommée à Madagascar. De plus, il constitue le prélèvement le plus facile à avoir car pas cher.

Les échantillons sont également en nombre assez réduits pour ce qui est des produits avicoles issus de volailles élevés traditionnellement. Cette réduction a été volontaire car les animaux issus des élevages traditionnels ne reçoivent que très peu, sinon jamais, de traitements médicamenteux.

### **3.1.3. Discussion des résultats**

#### **3.1.3.1. Origine des résidus**

La présence de résidus dans les poulets (chair et foie) peut résulter d'une utilisation prolongée de médicaments vétérinaires, que ce soit dans le cadre d'une thérapie préconisée par le praticien ou dans le cas d'une automédication. En effet, cette dernière se caractérise par une mauvaise utilisation ou une utilisation abusive du médicament [3].

Il peut s'agir également d'un non respect du délai d'attente lors d'un abattage précoce motivé par une demande plus importante (fêtes de Noël et de Pâques) ou pour limiter les pertes suite à l'apparition d'une pathologie dans l'élevage. Dans ce cas, les résidus découlent d'une prévention ou d'un traitement avant et/ou durant la maladie. Selon KONE [14], les animaux traités d'urgence, puis abattu sans le respect du délai d'attente constituent un réel danger pour les consommateurs.

#### **3.1.3.2. Rôle de la voie d'administration**

La voie d'administration des antibiotiques la plus usitée en aviculture est la voie orale. C'est-à-dire l'incorporation du médicament dans l'eau de boisson ou dans les aliments. La consommation de chaque animale étant supposée proportionnelle à son poids. Or, des facteurs individuels peuvent modifier le comportement et donc la consommation des animaux. Le vétérinaire n'a donc aucune maîtrise sur la dose réellement consommée par chaque oiseau [3]. De plus, la dose administrée est proportionnelle à la solubilité de l'antibactérien. Si un dépôt se forme au fond du

réceptif d'eau de boisson, chaque animal ne consomme pas totalement la teneur en principe actif qui lui est destinée. Ainsi, certains guérissent et d'autres non. Ces derniers peuvent développer alors une antibiorésistance contre la molécule administrée.

### **3.1.3.3. Cas particulier des analyses de foies**

Certains des médicaments qui ont fait l'objet de cette étude sont métabolisés par le foie et éliminés par voie biliaire. C'est un facteur de persistance des molécules au niveau de cet organe. De plus, ces médicaments subissent un cycle entérohépatique (réabsorption intestinale) qui ralentit leurs éliminations. Enfin, beaucoup de molécules ont une affinité pour les organes richement vascularisés dont le foie.

L'analyse des foies peut également mener à des faux positifs (2 à 3%) car la bile et les sels biliaires sont inhibiteurs pour de nombreux germes, en particulier pour les germes « tests » employés [3]. Néanmoins, comme le foie de volaille est un aliment largement consommé à Madagascar, l'étude des résidus qu'il peut contenir n'est pas totalement dépourvue de sens. Elle doit même interpeller sur les délais d'attente pratiqués (muscles et/ou foie) si le foie est consommé ou non. En effet, [23] a démontré que le temps d'attente fixé par les laboratoires pharmaceutiques et indiqué sur la notice et le conditionnement des médicaments n'est pas valable pour le foie (mais valable uniquement pour les denrées indiquées : muscles, lait, œuf).

## **3.2. Recommandations**

### **3.2.1. Recommandations pour les autorités administratives**

- Limiter la pratique de la médecine vétérinaire aux seuls vétérinaires (ne pas l'étendre aux ingénieurs et techniciens d'élevage) ;
- Réglementer l'exercice des techniciens vétérinaires pour qu'ils soient toujours sous la surveillance et sous la responsabilité des médecins vétérinaires ;
- Réglementer la diffusion et l'utilisation des molécules présentant un risque élevé pour la santé publique (utilisées en médecine humaine par exemple) de telle sorte qu'elles soient uniquement administrées sur ordonnance ;
- Interdire les molécules réellement dangereuses pour la santé humaine et pour les exportations avicoles du pays ;
- Faire régulièrement des campagnes d'information ;

- Fixer un délai d'attente pour le foie ;
- Procéder à des analyses régulières de la filière ;
- En l'absence d'un abattoir/tuerie unique et à cause de l'importance de la commercialisation des poulets de chair vivants (non estampillés), il est important de mettre en place un système de traçabilité et conditionner la circulation/vente des animaux par la délivrance d'un certificat sanitaire (surtout pour les ventes groupées). Ce dernier ne fera pas uniquement état de l'absence de maladie mais également de la qualité hygiénique (traitement des animaux et délai d'attente) ;
- Ne pas sanctionner sévèrement les éleveurs mais plutôt de mettre à leur disposition (gratuitement si possible) un service d'aide et de suivi visant à les aider à surmonter le problème ;
- Multiplier l'aide et les services des structures de formation et d'encadrement des éleveurs.

### **3.2.2. Recommandations pour l'ordre des vétérinaires et les praticiens**

- Ne pas traiter des animaux destinés à être abattus avant la fin du délai d'attente ;
- Connaître les antibiotiques utilisés en antibiosupplémentation car il y a risque d'interaction (antagonisme) avec ce que le praticien prescrit ;
- Eviter les « consultations à distance » (sans voir les animaux) car elle pousse à l'automédication ;
- Les prescriptions doivent toujours se faire sur ordonnance ;
- Eviter la vente sans ordonnance et surtout sans suivi des antibactériens ;
- Faire attention aux associations de médicaments et en respecter les règles : tenir compte
  - des propriétés bactériologiques de chaque antibiotique pour éviter les problèmes d'antagonisme ;
  - des caractéristiques pharmacocinétiques de chaque antibactérien car les antibiotiques associés doivent avoir des comportements similaires ou complémentaires ;
  - des données toxicologiques : proscrire l'association d'antibiotiques ayant une toxicité sur une même organe [3] ;

- Respecter la dose (si trop : allongement du délai d'attente ; si pas assez : risque d'apparition de résistance) : ne pas oublier que la posologie tient compte du nombre de sujets à traiter, du traitement (préventive ou curative), du poids moyen et de l'âge des sujets ;
- Respecter la durée d'utilisation : accumulation (Colistine) et allongement du délai d'attente ;
- Conscientiser les éleveurs sur la nécessité de respecter la dose, la durée d'utilisation et le délai d'attente pour chaque médicament.
- Ne pas hésiter à procéder à des analyses sur les carcasses douteuses (si positif, transmission de l'information aux autorités compétentes qui vont aider la ferme).

### **3.2.3. Recommandations pour les associations d'éleveurs et les aviculteurs**

- Respecter l'hygiène de l'élevage car elle diminue la charge bactérienne donc l'apparition des maladies et le recours aux médicaments ;
- Avoir recours au service d'un vétérinaire [3] ;
- Proscrire l'automédication ;
- Se former à la pratique de l'aviculture ;
- Avoir un programme de prophylaxie ;
- Respecter le programme de prophylaxie ;

### **3.2.4. Recommandations aux consommateurs**

- Exiger la qualité hygiénique (respect des LMR) même si c'est un peu plus coûteux ;
- Sensibiliser les consommateurs au risque liés aux résidus sans pour autant provoquer une psychose ;
- Mettre en place des structures d'aide et des centres d'information spécialisés pour les personnes ayant des problèmes particuliers mais précis avec les résidus (exemple : allergie aux pénicillines).

## CONCLUSION

L'aviculture malgache est une source non négligeable de protéines animales pour le pays. La demande en produits avicoles est en général plus élevée en période de fêtes (Noël, nouvel an et Pâques) et les fins de semaine. Le poulet, y compris le foie, est consommé de diverses manières (grillade, pâté, rôti, frit, bouilli).

L'élevage avicole constitue également une solution de remplacement pour la porciculture décimée par les maladies. Nombreux sont les éleveurs de porcs qui se sont reconvertis en aviculteurs.

L'élevage de volailles, traditionnel ou moderne, contribue au développement social et économique du pays. Souvent, à part les professionnels, femmes et enfants travaillent dans ce secteur. Les revenus que cette spéculation génère sont élevés.

Ce travail nous a rappelé les principales caractéristiques pharmacocinétiques et les indications principales de cinq familles d'antibiotiques : les bêta-lactamines, les tétracyclines, les macrolides, les aminosides et les sulfamides. Il nous prévient sur les médicaments qui s'éliminent par voie biliaire et qui subissent un cycle entérohépatique retardant leur élimination (tétracyclines et macrolides).

La méthode des quatre plaques utilisée pour cette étude est une méthode assez facile à mettre en oeuvre et abordable. En effet, elle fait appel au matériel de laboratoire classique. Elle nécessite cependant deux souches sensibles : *Bacillus subtilis* BGA et *Micrococcus luteus* ATCC9341. Les contraintes se situent surtout au niveau des prélèvements qui doivent être paucimicrobiens. C'est une condition majeure pour la lecture et l'interprétation des résultats. Peu spécifique mais sensible, cette méthode ne permet pas l'identification précise des résidus et leurs dosages.

Cette étude, réalisée dans le souci d'apporter une amélioration de la qualité des denrées alimentaires d'origine aviaire, a révélé que 36,72% des échantillons présentent une probabilité de contamination. Les résultats montrent également que ce sont les résidus d'aminosides qui sont les plus couramment rencontrés.

Le taux de contamination varie d'un marché à un autre mais est en général plus faible pour les supermarchés (E et F). Il varie de 14 à 50% en fonction du lieu de prélèvement. Cependant, pour les deux tiers des marchés étudiés, les aminosides arrivent en tête de la contamination.

Le mode d'élevage tient une place importante dans la probabilité de présence de résidus d'antibactériens. En effet, tous les cas de positivité, que ce soit pour le muscle ou le foie, ont été rencontrés uniquement dans les produits issus d'élevages rationnels donc modernes.

Sans doute à cause de sa fonction dans le métabolisme et l'élimination des médicaments vétérinaires, le foie est de loin plus contaminé que la chair. De plus, richement vascularisé, il constitue un site d'action privilégié pour beaucoup de molécules. Les résidus que cet organe contient proviennent de tout type d'antibiotiques. De tous les prélèvements de foie positifs aux analyses, 46,47% sont probablement contaminés par les aminosides.

Le niveau de contamination et donc la taille de la zone d'inhibition varie en fonction de la nature de la denrée analysée. De parmi les résultats positifs de la chair, le niveau I (zone d'inhibition de 2mm) concerne plus de 72% des cas. Les résidus sont ceux des aminosides. Pour le niveau II (2 à 4mm), les bêta-lactamines/macrolides sont les plus impliqués (18%). Quant au foie, le niveau I est dominé par les aminosides tandis que la répartition est assez homogène pour les autres molécules. Pour le niveau II, le taux est curieusement faible pour les aminosides (2%) et plus importantes pour les autres antibactériens (5%).

Les probabilités de présence de résidus multiples sont surtout décelables pour le foie car, de parmi les résultats positifs, seuls 42% sont mono résiduels. Le risque est identique pour la présence simultanée de deux ou de trois résidus (13%). La probabilité d'avoir simultanément quatre types de résidus est de 32%. A 82%, le muscle est mono résiduel.

Les résultats de ce travail nous ont amené à faire quelques recommandations pour les autorités administratives, l'ordre des vétérinaires et les praticiens, les aviculteurs et les associations de consommateurs.

Nous recommandons à l'administration de limiter la pratique de la médecine vétérinaire aux seuls vétérinaires, d'établir des règlements clairs et spécifiques sur l'utilisation des antibactériens, de multiplier les campagnes d'information et de procéder à des analyses régulières pour identifier et aider les éleveurs ayant des problèmes de résidu.

Nous interpellons l'ordre des vétérinaires et les praticiens pour que ces derniers redoublent de précaution lors de leurs prescriptions et tiennent compte de la dose, de la durée d'utilisation et du délai d'attente. Ils doivent lutter contre l'automédication en conscientisant les éleveurs sur les risques liés aux résidus antibactériens.

Nous recommandons aux éleveurs de se former à la pratique de l'aviculture. Ce faisant, ils respecteront l'hygiène de l'élevage et leurs plans de prophylaxie. Ils doivent proscrire l'automédication et avoir recours aux services d'un vétérinaire praticien.

Enfin, nous encourageons les associations des consommateurs à multiplier les campagnes d'information sur les LMR pour sensibiliser le public. Les acheteurs devraient préférer la nourriture saine. Si possible, des centres doivent être mis en place pour informer et aider les personnes ayant des problèmes vis-à-vis des résidus.

# BIBLIOGRAPHIE

**1. ABADJINA K. A., 1987.**

Bilan des shigelloses en milieu hospitalo-universitaire dakarois et résistance aux antibiotiques 1973-1980.

Dakar : Thèse : Méd./Pharm., (74)

**2. AFSSA, 2000.**

Détection des résidus à activité antibiotique dans les muscles : méthode des quatre boîtes.

Paris : Ed. Fougères : Laboratoire d'Etude et de Recherches sur les Médicaments Vétérinaires et les Désinfectants et Laboratoire National de Référence, 11 pages.

**3. BIAGUI C., 2002.**

Utilisation des médicaments vétérinaires en élevages avicoles dans la région de Dakar ; qualité de la viande à travers la recherche de résidus de substances à activité antimicrobienne (antibiotiques).

Dakar : Thèse : Méd. Vét., (8)

**4. BOURIN M. ; JOLLIET P., 1999.**

La résorption des médicaments : cas particulier de la voie orale (13 -16). In : Pharmacologie générale et pratique. – 3<sup>ème</sup> édition.

Paris : Ellipses/Edition Marketing, 142 pages.

**5. BOURIN M. ; LIEVRE M. et ALLAIN H., 1993.**

Médicaments anti-infectieux (291-338). In : Cours de pharmacologie. – 3<sup>ème</sup> édition.

Paris : Ellipses/Edition Marketing, 351 pages.

**6. BRANDER G. C. ; PUGH D. M. ; BYWATER R. J., 1982.**

Veterinary applied pharmacology & therapeutics.

London : Baillière Tindall, 581 pages.

**7. CHATAIGNER B. et STEVENS A., 2004.**

Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar. <En ligne>-Accès Internet

[http://www.redev.info/Doc/Polagri/III-Pol-Agri-securite-alimentaire/III-3-Dev-local/Enquete\\_residus\\_AB\\_Senegal.pdf](http://www.redev.info/Doc/Polagri/III-Pol-Agri-securite-alimentaire/III-3-Dev-local/Enquete_residus_AB_Senegal.pdf)

**8. COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS, 1994.**

Codex Alimentarius : Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires.

Rome : FAO/OMS : 2, 477 pages.

**9. DIOP D., 1991.**

Etude des résidus d'ampicilline dans les œufs de poule après traitements par voie orale et intramusculaire.

Dakar : Thèse : Méd. Vét., (27)

**10. DIOP M. M., 2003.**

Etude des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits aviaires de la zone des Niayes (Sénégal).

Dakar : Thèse : Méd. Vét., (17)

**11. EDDER P., 2002.**

Analyse des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. <En ligne>-Accès Internet

[http://www.geneve.ch/consommation/docs/medicamenteux\\_final.pdf](http://www.geneve.ch/consommation/docs/medicamenteux_final.pdf)

**12. FONTAINE M. ; CADORE J. L., 1995.**

Vade – mecum du vétérinaire. – 16<sup>ème</sup> édition.

Paris : Vigot, 1672 pages.

**13. HOGARTH J., 1997.**

Vocabulaire de la santé publique.

Copenhague : OMS/Bureau Régional de l'Europe, 271 pages.

**14. KONE P. S., 1992.**

Recherche des résidus de chloramphénicol dans les viandes de ruminants en Côte d'Ivoire : mise en place d'une méthode analytique.

Dakar : Thèse : Méd. Vét., (47)

**15. LARPENT J.P., 1997.**

Microbiologie alimentaire : techniques de laboratoires.

Paris : Technique et documentation, 1073 pages.

**16. LARPENT J.P., LARPENT G.M., 1991.**

Mémento technique de microbiologie.

Paris : Technique et documentation, 417 pages.

**17. LARPENT J.P., LARPENT G.M., 1970.**

Microbiologie pratique.

Paris : Herman, 203 pages.

**18. MADAGASCAR/Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche, 2004.**

Statistiques administratives.

Antananarivo : Direction de la santé animale et du phytosanitaire.

**19. MADAGASCAR /Ministère de la Population et des Conditions Féminines, 2002.**

Statistiques administratives.

Antananarivo : Centre de documentation du Ministère de la Population et des Conditions Féminines, 12 pages.

**20. MAGHUIN-ROGISTER G. ; JANOSI A. ; HELBO V. ; VAN PETEGHEM C. ; SANDERS E. ; VAN EECKHOUT N. ; CORNELIS M. et JOURET M., 2001.**

Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans la denrée alimentaire. <En ligne>-Accès Internet <http://139.165.180.63/OSTC/>

**21. MAURY M., 1987.**

Milieux et réactifs de laboratoire pasteur.

Paris : Diagnostics Pasteur : 3, 728 pages.

**22. OXOID, 1992.**

Le manuel OXOID.

Paris : Unipath SA, 374 pages

**23. RANAIVO J. L. U., 2005.**

Mise en place d'un protocole de détection des résidus à activité antibiotique dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Antananarivo : Mémoire DEA – Biochimie, 76 pages.

**24. RASAMOELINA A. H., 2005.**

Contribution à l'épidémiologie des principales maladies parasitaires et infectieuses ovines et mises en place d'un réseau d'épidémiosurveillance dans la zone du lac Alaotra, Madagascar.

Dakar : Thèse : Méd. Vét., (20)

**25. SCHAPIRA G., 1959.**

Elément de biochimie.

Paris : Ed. Flammarion : 2, 348 pages.

**26. SNEATH P., 1986.**

Bergey's manual of systemic bacteriology.

Londres : Waverly : 2, 1599 pages.

**27. SINGLETON P. ; DUSART J., 1994.**

Bactériologie.

Paris : Ed. Masson, 247 pages.

**28. SINGLETON P. ; SAINSBURY D., 1984.**

Bactériologie.

Paris : Ed. Masson, 151 pages.

**29. TOUITOU Y., 1974.**

Pharmacie. – 4<sup>ème</sup> édition.

Paris : Masson et C<sup>ie</sup>, 273 pages.

**30. YATUA B., 2006.**

Etude de l'évolution des œufs de consommation dans les conditions de stockage naturelles.

Dakar : Thèse : Méd. Vét., (22)

# **ANNEXES**

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE 1 : Milieux de culture, diluants, réactifs et colorants utilisés

ANNEXE 2 : Techniques d'isolement, d'identification et de conservation des germes-tests

ANNEXE 3 : Zone d'inhibition autour des échantillons et couches compactes

ANNEXE 4 : Traitement des échantillons

## ANNEXE 1

### Milieux de culture, diluants, réactifs et colorants utilisés

Milieux de culture	Diluants	Réactifs et colorants
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Gélose tryptone soja (GTS)</b></li> <li>- <b>Test agar de pH 6</b></li> <li>- <b>Test agar de pH 7,4</b></li> <li>- <b>Test agar de pH 8</b></li> <li>- Finley et Fields</li> <li>- Milieu Mueller-Hinton</li> <li>- Mossel</li> <li>- Gélose au sang</li> <li>- Citrate de Simmons</li> <li>- Kligler Hajna</li> <li>- Mannitol-mobilité-nitrate</li> <li>- Urée- indole</li> <li>- Bouillon de culture pour la congélation des souches (pour conservation)</li> <li>- Cryobilles (pour conservation)</li> <li>- Skim milk (pour conservation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau distillée</li> <li>- Eau physiologique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactifs de Kovacs</li> <li>- Réactifs de GREISS</li> <li>- Kit Gram</li> <li>- Kit de Bartholomew et Mittwer</li> <li>- Peroxyde d'hydrogène</li> <li>- Perchlorure de fer.</li> <li>- Polymixine B</li> </ul>

## ANNEXE 2

### TECHNIQUES D'ISOLEMENT, D'IDENTIFICATION ET DE CONSERVATION DES GERMES-TESTS.

#### 1- ISOLEMENT DES COLONIES MICROBIENNES

L'isolement permet d'obtenir les souches pures indispensables à toute étude et identification bactériologiques.

Les techniques sont basées sur l'obtention d'un clone c'est-à-dire d'une culture issue d'une cellule.

L'inoculum peut être prélevé à l'éöse (milieu solide ou liquide) puis déposé et étalé sous forme de stries épuisantes à la surface de la gélose.

#### 2- EXAMEN MICROSCOPIQUE A L'ETAT FRAIS

##### But

Observer les bactéries vivantes en l'absence de toute fixation ou coloration. Cette méthode permet d'observer :

- La morphologie des bactéries
- Leur mode de groupement
- Et leur mobilité.

##### Préparation de la suspension de culture bactérienne

- Choisir une culture jeune d'un bouillon ou d'une boîte gélosée ou d'un tube gélosé en pente.
- Pointer une colonie isolée à l'aide d'une pipette Pasteur à bout effilé
- Introduire la colonie dans le tube à hémolyse contenant au préalable le solvant ( eau distillée, eau physiologique, eau peptonnée salée alcaline,...), mettre en contact progressivement au solvant tout en frottant sur la paroi du tube pour disloquer ou morceler la colonie : le but de la manœuvre est d'avoir une dissolution totale (complète).
- Mettre une goutte de suspension entre lame et lamelle.
- Luter avec de la paraffine.
- Poser la lame sur le plateau du microscope.
- Mettre de l'huile d'immersion et observer à l'objectif x 100.

#### 3- COLORATION DE GRAM

##### **Objectif**

Le but de la manipulation est d'aider à l'identification bactérienne. Outre le renseignement Gram + ou Gram -, cette technique offre d'autres renseignements qui peut aider à l'identification comme :

- La morphologie des bactéries : arrondies (cocci), en batonnet, coccobacille.

- Le mode d'agencement des bactéries qui est parfois spécifique à une famille (chaînettes chez les *streptocoques*, en grappe chez les *staphylocoques*).
- Le mode de division des microbes : par sisciparité, suivant un plan, ou suivant deux plans.
- La présence ou non des spores et leur emplacement.
- La pureté de matériel biologique.
- La taille des bactéries.

## Principe

Le principe de la manipulation est basé sur la capacité de la paroi bactérienne à retenir ou non le colorant violet de Gentiane après décoloration à l'alcool.

## Matériel

- **Biologique :**

- Culture bactérienne pure (colonie isolée), mélange de microbes, frottis biologique.
- Prélèvement cervico-vaginale
- Pus
- Crachats et autres

- **De laboratoire :**

Tubes à hémolyse et petit portoir, eau physiologique stérile, lame porte objet bien dégraissée, pipette pasteur, plaque chauffante, papier joseph, huile à immersion, bec Bunsen, Crayon diamant, microscope optique.

- **Réactifs**

- Violet de Gentiane concentré ou prêt à l'emploi.
- Mélange Alcool-acetone (un volume d'alcool 90° + 9 volumes d'acétone)
- Fuschine de Zhiel concentré ou prêt à l'emploi.
- Lugol
- Eau

## Méthodes

### Préparation des réactifs :

- Violet de Gentiane concentré :
- Faire un mélange du violet de gentiane concentré avec de l'eau phéniquée à 3% de telle sorte que la concentration finale du violet + eau phéniquée soit égale à 10%.
- Fuschine de Ziehl :
- Mélanger le fuschine de Ziehl concentré avec de l'eau phéniquée à 5% de telle sorte que la concentration finale du colorant soit égale à 10%.

- Lugol :  
1 g d'iode + 2 g d'iodure de potassium + 300 ml d'eau distillée.

### Mode opératoire

- Faire une suspension bactérienne peu laiteuse à l'aide de trois gouttes d'eau physiologique stérile et de la colonie isolée (ou mélange de colonies) dans un tube à hémolyse. Ne pas mettre la ou les colonies à identifier en contact direct avec l'eau distillée ou l'eau physiologique stérile mais la ou les disloquer d'abord contre la paroi du tube. Utiliser de préférence une culture jeune.
- Marquer la lame à l'aide d'un crayon diamant pour savoir la face à colorer et marquer également l'endroit où mettre la suspension à colorer par un cercle.
- Déposer une goutte de la suspension bactérienne sur la lame à l'aide du pipette pasteur et l'étaleur. Pour le cas des autres matériels biologiques (pus, etc.) veiller à ce que le liquide à étaler ne soit pas trop épais. Pour le cas des crachats, les étaler en stries.
- Sécher à l'air libre ou sur plaque chauffante.
- Fixer les bactéries par la chaleur ( sur plaque chauffante ou en passant trois fois la face à colorer sur la flamme du bec Bunsen). Il est possible de fixer la lame à l'alcool.
- Laisser refroidir la lame.
- Recouvrir la lame avec le violet de Gentiane péniqué filtré extemporanément c'est-à-dire verser le violet de gentiane péniqué sur la lame à travers du papier joseph ou papier filtre.
- Eliminer le violet péniqué en rinçant avec le Lugol jusqu'à ce que le reflet métallique disparaisse, puis recouvrir de Lugol et laisser en contact deux fois le temps de pause du violet de Gentiane péniqué.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Décolorer la lame avec l'alcool acétone par un mouvement de bascule jusqu'à ce que l'alcool acétone n'entraîne plus le violet et soit incolore à 'appréciation du technicien.
- Laver rapidement à l'eau du robinet.
- Recolorer avec le Fuschine qu'on filtre extemporanément à travers du papier joseph. Prendre soin de déposer une goutte d'eau sur la lame avant coloration à la Fuschine. Laisser en contact le même temps que le violet de Gentiane péniqué.
- Rincer abondamment puis laisser sécher à l'air libre.
- Observer au microscope après dépôt d'une goutte d'huile d'immersion sur le frottis (grossissement x 100)

**Bactéries « Gram positives »** gardent la coloration violette après décoloration par l'alcool.

**Bactéries « Gram négatives »**, décolorées par l'alcool sont teintées par Fuschine et apparaissent roses ou rouges.

Cette positivité ou négativité du Gram varie donc d'une famille ou d'une espèce bactérienne à l'autre. Elle dépend aussi, pour une même espèce de l'âge et de la culture. La positivité Gram s'affaiblit avec le vieillissement.

#### **4- TESTS BIOCHIMIQUES**

Ces tests ont pour but de rechercher les équipements enzymatiques de la bactérie étudiée. Ils permettent donc de distinguer différents genres ou espèces en se basant sur des différences de métabolisme.

##### **Recherche de l'Oxydase**

Ce test établit si une bactérie contient ou non un certain type de cytochrome dans sa chaîne respiratoire.

On utilise le disque OX imprégné d'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine à 1% (incolore sous forme réduite). Une goutte d'eau distillée stérile est placée à l'aide d'une pipette pasteur sur le disque. Une petite portion de colonie pure est ensuite mise en contact avec le disque. L'apparition de coloration rouge violet révèle la présence de l'enzyme Cytochrome Oxydase qui a oxydé le substrat du départ.

##### **Test d'O.N.P.G**

Les entérobactéries qui acidifient les milieux lactosés possèdent deux enzymes :

- la  $\beta$  galactoside perméase qui est l'enzyme nécessaire à la pénétration du lactose dans la bactérie.
- La  $\beta$  galactosidase qui est l'enzyme qui coupe le lactose en glucose et galactose.

Si la  $\beta$  galactoside perméase est déficient ou absent, la bactérie qui devrait être lactose +, apparaîtra lactose -.

L'acidification du milieu apparaîtra tardivement ou même n'apparaîtra pas du tout.

Il faut donc le révéler car cette enzyme est d'une grande importance dans le diagnostic de différenciation dans la classification microbienne.

On le révèle au laboratoire par la recherche de l'ONPG.

Une solution d'ONPG est incolore. Cette molécule est scindée, comme le lactose par de la  $\beta$  galactosidase qui libère l'orthonitrophénol de couleur jaune en solution. Cette réaction se recherche en milieu tamponné.

On recolle des bactéries sur un milieu lactosé (sur la pente du milieu Hajna-Kligler), On fait une solution épaisse (laiteuse) dans 0,5 ml d'eau distillée. Plus il y a de bactéries, plus la réaction est rapide car il a plus d'enzymes.

Mettre un disque ONPG dans cette solution, et incuber à 37°C pendant 15 mn à 1 heure. Mais au bout de 30 mn, on peut avoir un résultat. Si la couleur reste inchangée, attendre encore 24 heures, car il y a des réactions tardivement positives.

On parle d'ONPG +, lorsqu'il y a apparition de couleur jaune due à la libération de l'orthonitrophénol.

On parle d'ONPG -, lorsque la solution ne subit aucune modification.

##### **Production de catalase**

Cette enzyme catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène qui est produit par certaines réactions cellulaires et est très toxique. Le test de catalase permet de déceler la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne. Il consiste essentiellement à ajouter

du peroxyde d'hydrogène à des bactéries ou vice versa : la présence de catalase donne lieu à l'apparition de bulles d'oxygène.

Le mode opératoire est le suivant : Un fragment d'une colonie bactérienne est transféré au moyen d'une boucle dans une goutte d'eau déposée sur une lame porte-objet et contenant du peroxyde d'hydrogène.

### **Test API 20 E**

L'API 20 E est un système d'identification des Entérobactéries, Oxydase négatives et Gram négatif. Ce système comporte 20 microtubes contenant 20 substrats différents.

- Verser environ 5ml d'eau distillée dans la boîte d'incubation dans le but de maintenir l'humidité durant l'incubation.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation
- Préparer la suspension microbienne avec 5ml d'eau physiologique et une colonie bien isolée.
- Remplir tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL.
- Remplir uniquement les tubes (non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, H<sub>2</sub>S, UREE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.
- Lecture de résultats suivant le tableau de lecture de la notice technique.
- Remplir la fiche de résultats et transformer les résultats sous forme de code numérique et le code sont ensuite rapportés sur le livre du catalogue analytique pour identifier le microbe étudié.

Après toutes ces séries d'expériences, les résultats obtenus sont portés sur le tableau de lecture pour identifier l'espèce en question.

## **5- CONSERVATION**

La conservation est effectuée soit par l'intermédiaire de Cryo-billes, Skim milk, milieu gélosé, soit par milieu pour la congélation des souches en microtubes operculés.

### **Conservation à court terme**

La plupart des bactéries peuvent être conservées pendant une à deux semaines à la surface d'un milieu gélosé (gélose nutritive). Les boîtes doivent être entreposées à 4°C, renversées et hermétiquement fermées à l'aide de parafilm.

### **Conservation à long terme**

#### **Cryo-billes :**

- Prélever des colonies pures à l'aide d'une pipette pasteur stérile (très chargée).
- Introduire ce prélèvement dans un petit flacon de Cryo-billes et agiter énergiquement.

- Enlever une petite quantité de la suspension en aspirant jusqu'au niveau des billes avec de la pipette pasteur.
- Conserver le flacon à une température inférieure ou égale à  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Skim milk :**

- Prélever des colonies pures à l'aide d'une pipette pasteur stérile (très chargée).
- Introduire ce prélèvement dans un microtube contenant du milieu Skim milk congelé, tout en évitant la décongélation et en mélangeant délicatement avec cette pipette.
- Conserver le flacon à une température inférieure ou égale à  $-18^{\circ}\text{C}$ .

### ANNEXE 3

**Zone d'inhibition autour des échantillons et couches compactes**



*Photo : RANAIVO Jean Luc Ursus*

## ANNEXE 4

Illustration de la technique : traitement des échantillons (cas des muscles de zébu)



Découpage d'une carotte cylindrique avec un emporte-pièce



Découpage des rondelles avec un bistouri

INVESTIGATION SUR LA PRESENCE DE RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS  
LES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE AVIAIRE COMMERCIALISEES A  
ANTANANARIVO (MADAGASCAR) : CAS DU MUSCLE ET DU FOIE

**RESUME**

Cette a été réalisée avec la méthode des quatre plaques.

Elle a révélé que la probabilité de la présence de résidus d'antibiotiques dans les poulets vendus à Antananarivo (chair et foie confondus) est de 36,72%.

De manière plus spécifique, elle fait également ressortir que le risque varie de 14 à 50% en fonction du marché où les échantillons ont été prélevés. Néanmoins, le taux de contamination est supérieur à 28% dans les 5/6 des marchés étudiés.

Elle a aussi montré que, parmi les antibiotiques testées, les Aminosides sont les plus impliquées car leurs résidus sont présents sur tous les marchés. Tous les types de résidus (Beta-Lactamines et/ou les Macrolides, tétracyclines, sulfamides, aminosides) sont retrouvés au niveau des 2/3 des points de vente étudiés.

Le mode d'élevage influence le risque car c'est seulement dans les produits issus d'élevages modernes que des résidus ont été trouvés.

Une comparaison entre le muscle et le foie démontre que ce dernier est plus contaminé. Tous les types de résidus se rencontrent dans le foie. Par contres seuls les Aminosides, les Beta-Lactamines et/ou les Macrolides sont dans la chair.

En général, le niveau de contamination correspond à la limite maximale de résidus (LMR).

L'étude a également révélé des cas de contaminations multiples. Généralement, le muscle est contaminé par un seul type de résidu, rarement deux. Le foie quant à lui, contient majoritairement un ou quatre types de résidus.

**Mots-clés** : résidus, antibiotiques, muscle, foie, Antananarivo

**Auteur** : RANDRIANOMENJANAHARY Riana Nantenaina

**Adresse** : Lot IVK 179 Ankadifotsy Antananarivo MADAGASCAR

**Tel** : (00)261 20 22 323 31 / (00)261 33 11 564 69

**Email** : rn\_78@yahoo.fr