

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université « Dr. MOULAY Tahar » de Saida

Faculté des sciences

*Département de biologie*

*Laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des  
plantes*



*Mémoire*

Présenté pour l'obtention d'un diplôme du Master en biologie

**Option** : Microbiologie appliquée

Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de l'Oxytétracycline  
exposé à certains traitements thermiques sur certaines bactéries à Gram  
positif et à Gram négatif

**Présenter par :**

M<sup>elle</sup> Djellouli Keltouma

M<sup>elle</sup> Amari Lamia

**Soutenue publiquement, le 17.10.2017 devant le jury composé de :**

Mr. Kahloula.K	<b>Maitre de conférence « A »</b>	<b>Université de Saida</b>	<b>Président</b>
Mr. ADLIDE.H	<b>Maitre de conférences « B »</b>	<b>Université de Saida</b>	<b>Examineur</b>
Mr. ZIANI.K	<b>Maitre de conférences « B »</b>	<b>Université de Saida</b>	<b>Encadreur</b>

Année universitaire : 2017/2018



# Remerciements

**Au terme de ce travail :**

- Tout d'abord, on remercie notre bon **\*Dieu\*** qui nous avons éclairés les chemins du savoir et nous avons accordés la patience à réaliser ce travail.
- On tient à exprimer toute notre reconnaissance à notre Directeur de mémoire **Mr ZIANI. K.** On la remercie de nous avoir encadrés, orientés, aidés et conseillés à réaliser ce modeste travail.
- Nous adressons nos remerciements à **Mr HAMAD AHMED** pour ses efforts fournis pendant la réalisation de travail au niveau de laboratoire.
- On adresse nos sincères remerciements à tous **les professeurs (Ms KAHLOILA .K, ADLIDE .H)**, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nous rencontrer et répondre à nos questions durant notre recherche.

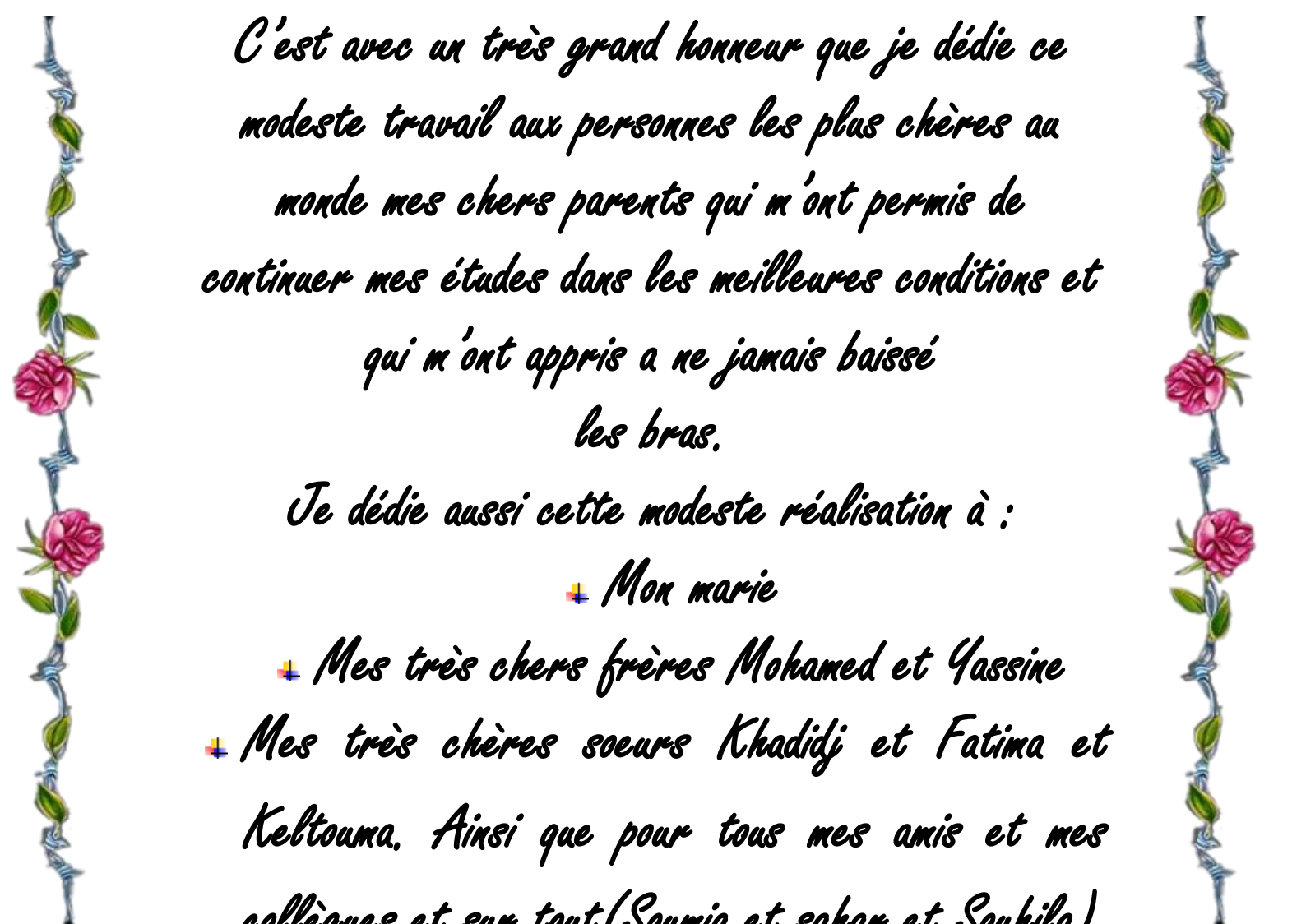
♥ **AMARI LAMIA**

♥ **DJELLOULI KELTOUMA**





Dédicace



*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce  
modeste travail aux personnes les plus chères au  
monde mes chers parents qui m'ont permis de  
continuer mes études dans les meilleures conditions et  
qui m'ont appris à ne jamais baisser  
les bras.*

*Je dédie aussi cette modeste réalisation à :*

*✚ Mon mari*

*✚ Mes très chers frères Mohamed et Yassine*

*✚ Mes très chères sœurs Khadidj et Fatima et  
Keltouma. Ainsi que pour tous mes amis et mes  
collègues et sur tout (Soumia et sahar et Souhila)*

**LAMIA.A**





# **DEDICACE**

*Arrivé au terme de ce modeste travail, grâce à*

**«ALLAH »**

*Il m'est très agréable de le dédier à:*

*Mes très chers parents*

*Mes frères et mes sœurs*

*Et à la miséricorde de mes frères sur lui*

*Toute ma famille.*

*Et islam et Ayoub*

*Mon marie*

*Tous mes amis (es) .*

*A mon binôme : Lamia qui j'ai partagé avec elle le bon et le mauvais depuis  
le début de ce travail.*

*En fin à tous qui ont participé de près ou de loin pour  
L'accomplissement de ce modeste travail...*

**Keltouma.D**



## Abstract

Antibiotics are the main medicaments used in human and veterinary medicine. OTC is one of the most widely used antibiotics for the treatment of infectious diseases within farmed animals. The objective of this study is to evaluate the antibacterial activity of the OTC and the stability of its chemical structure following exposure to heat treatments. We began our approach by choosing the bacterial strains that have been shown to have a natural resistance or sensitivity known from the literature with respect to this drug. The latter has been exposed to various heat treatments (80, 100, 120, 140 and 160 ° C). Using an absorption spectrophotometer checks the stability of the chemical structure, whereas the modification of the antibacterial activity is measured by the minimum inhibitory concentration (MIC) and the diameter of the inhibition zone. Initial results showed that ATB-sensitive bacteria became more sensitive from 120 ° C, so the naturally resistant bacterium showed marked sensitivity. The effect of heat treatment caused a change of the molecule that generates the appearance of a new toxic or bioactive product. This can be creating serious problems for consumers' health following the consumption of food products of animal origin contains previously cooked OTC residues or which have undergone a technological treatment based on high temperatures.

**Key words:** Oxytetracycline, bacterial strains, heat treatments, and antibacterial activity.

## Résumé

Les antibiotiques sont les principaux médicaments utilisés dans la médecine humaine et vétérinaire. L'OTC est l'un des antibiotiques le plus employé pour le traitement des maladies infectieuses chez animaux d'élevage. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'OTC et la stabilité de son structure chimique suite à l'exposition aux traitements thermiques. La démarche a débuté par le choix des souches bactériennes qu'ont présenté une résistance ou une sensibilité naturelle connue selon la littérature vis-à-vis ce médicament. Ce dernier est exposé à différents traitements thermiques (80, 100, 120, 140 et 160 °C). La stabilité de la structure chimique est vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption, tandis que, la modification de l'activité antibactérienne est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition. Les premiers résultats ont montré que les bactéries sensibles à l'ATB devenaient plus sensibles à partir de 120°C, de même la bactérie qui était naturellement résistante a montré une sensibilité marquée. L'effet de traitement thermique a provoqué un changement de la molécule qui engendre l'apparition d'un nouvel produit toxique ou bioactif. Cela peut être créé des problèmes sérieux pour la santé du consommateur suite à la consommation des produits alimentaires d'origine animale contenant au préalable des résidus des OTCs cuits ou qui ont subi à un traitement technologique basé sur des températures élevées.

**Mots clés :** Oxytétracycline, souches bactériennes, traitements thermiques, activité antibactérienne.

## ملخص

المضادات الحيوية هي الأدوية الرئيسية المستخدمة في الطب البشري والبيطري حيث ان oxytetracycline هو الأكثر استخداما على نطاق واسع لعلاج الأمراض المعدية لدى المواشي. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط المضاد البكتيري ل OTC واستقرار تركيبه الكيميائي بعد تعرضه لدرجات الحرارة المختلفة. حيث بدأت الدراسة باختيار السلالات البكتيرية التي ثبت أن لديها مقاومة طبيعية أو حساسية معروفة لهذا المضاد البكتيري . نعرض هذا الأخير لمختلف درجات الحرارةية (80، 100، 120، 140 و 160 درجة حرارية) يتم التحقق من ثبات التركيب الكيميائي باستخدام spectrophotométre d'absorbance، بينما يقاس تغير النشاط المضاد البكتيري ل OTC عن طريق التركيز الأدنى للمثبط (MIC) وقطر منطقة التثبيط . وأظهرت النتائج الأولى أن البكتيريا الحساسة لهذا المضاد أصبحت أكثر حساسية ابتداء من 120 درجة حرارية ، وبالمثل البكتيريا المقاومة طبيعيا لهذا المضاد أظهرت حساسية ملحوظة. تأثير المعالجة الحرارية تسبب في التغيير الجزيء المكون لهذا المضاد حيث أدى إلى ظهور منتج جديد سام أو حيوي. وهذا يمكن أن يخلق مشاكل خطيرة لصحة المستهلك بعد استهلاك المنتجات الغذائية من أصل حيواني يحتوي على مخلفات المضاد المطبوخة سابقا أو التي خضعت لمعالجة تكنولوجية على أساس درجات حرارة عالية

الكلمات المفتاحية : Oxytetracycline, السلالات البكتيرية, درجات الحرارة, النشاط المضاد للبكتيريا .

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acides désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>AFNOR</b>	Agence Française de Normalisation
<b>AFSSA</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>AMP</b>	Ampicilline
<b>AMX</b>	Amoxicilline
<b>ARF</b>	Antibiotiques Régulateurs de flore
<b>ARN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide désoxyribonucléique messagère
<b>ATB</b>	Antibiotique
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>°C</b>	degré Celsius
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CEE</b>	Communauté Economique Européenne
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CPG</b>	Code de Santé Publique (catégorie socioprofessionnelle)
<b>CTC</b>	Chlorotétracycline
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DOC</b>	Doxycycline
<b><i>E. Coli</i></b>	<i>Escherichia Coli</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay
<b>ELL</b>	Extraction Liquide-Liquide
<b>Gram (-)</b>	Gram negative
<b>Gram (+)</b>	Gram positive
<b>g</b>	gramme



<b>h</b>	hear
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide a Haute Performance
<b>HTCT</b>	Haute Temperature à Court Terms
<b>Kg</b>	Kilogramme
<b>L</b>	Litre
<b>LMR</b>	Limite Maximale de Résidus
<b>mg</b>	milligramme
<b>MH</b>	Muller-Hinton
<b>min</b>	minute
<b>ml</b>	millilitre
<b>mm</b>	millimètre
<b>mol</b>	moule
<b>nm</b>	nano mètre
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OTC</b>	Oxytétracycline
<b>OXA</b>	Oxacilline
<b>PCM</b>	Pénicilline
<b>PH</b>	Potentiel hydrique
<b>PLP</b>	Protéines de liaison à la pénicilline
<b>SMZ</b>	Sulfaméthazine
<b>TC</b>	Tétracycline
<b>UE</b>	Union européenne
<b>UEMOA</b>	Union économique et monétaire ouest-africaine
<b>UFC</b>	Unité forment colonie
<b>µg</b>	micro-gramme
<b>µl</b>	micro-litre
<b>µ</b>	micro

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT

DEDICACE

ABSTRACT

RESUME

ملخص

LISTE DES ABREVIATION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : Généralité sur les antibiotiques

1.1. Introduction .....	03
1.2. Classification des antibiotiques .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 03
1.2.1. $\beta$ - lactamines .....	04
1.2.2. Aminosides.....	05
1.2.3. Quinolones .....	06
1.2.4. Macrolides et apparentés .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 06
1.2.5. sulfamides .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 06
1.2.6. Tétracyclines .....	07
1.2.6.1. Structure chimique .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 07
1.2.6.2. Mod d'action .....	07
1.2.6.3. Spectre d'activité .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 07
1.2.6.4. Mécanisme de résistance .....	08
A.Oxytétracycline .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 08
A.1. Caractéristiques et propriétés physiques .....	08
A.2. Propriétés chimiques.....	09
A.3. Activité antibactérienne .....	09
A.4. Mode d'action.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 09

B. Chlorotétracycline.....	10
C. Tétracycline .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 10
D. Doxycycline .....	10
E.Minocycline .....	10
1.3. Usage des antibiotiques .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 10
1.4.Problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans l'aliment.....	<b>Error!</b> Bookmark not defined.12
1.4.1.Problèmes sanitaires.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 12
1.4.2.Problèmes toxiques .....	12
1.4.2.1.Toxicité directe .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 12
1.4.2.2.Risques cancérogènes .....	12
1.4.2.3.Risques bactériologiques .....	12
1.4.3.Problèmes technologiques .....	13
1.4.4.Antibiorésistance .....	13
<b>Chapitre 02 : Résistance bactérienne aux antibiotiques</b>	
2.1.Introduction .....	<b>14</b>
2.2.Résistance naturelle .....	16
2.3. Résistance acquise .....	16
2.3.1.Mécanismes génétiques de la résistance acuse . .....	16
2.3.1.1.Résistance chromosomique .....	17
2.3.1.2.Résistance extra chromosomique .....	<b>17</b>
A. Transposons .....	18
B. Intégrons .....	18
2.3.2.Mécanismes biochimiques de résistance acquise .....	20
2.3.2.1.Mécanismes d'inactivations enzymatiques de l'antibiotique .....	20
A. $\beta$ -lactamases .....	21
A.1.Pénicillinases .....	21
A.2.Céphalosporinases .....	21
B.Enzymes inactivant les aminosides .....	22
C.Inactivation des quinolones.....	22
2.3.2.2.Modification de la pénétration des antibiotiques	<b>Error! Bookmark</b> not defined.22

2.3.2.3..Résistance par mécanisme d’efflux actif ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	23
2.3.2.4.Résistance par modification ou substitution de la cible .	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	24
A.Modifications des PLP .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	24
B .Modification de la cible ribosomiale .....		25
C.Altération de la synthèse des acides nucléiques .....		25
D.Modification du précurseur du peptidoglycane .....		26
E.Modification enzymatique de la cible .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	26
2.4.Facteurs favorisant l’antibiorésistance .....		26
2.4.1. Usage humain des antibiotiques .....		26
2.4.2. Usage vétérinaire des antibiotiques .....		27
2.4.2.1. Additifs alimentaires .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	27
2.4.3. Usage agricole des antibiotiques .....		27
2.4.3.1. Protection des cultures et plantes transgéniques .....		27

### **Chapitre 03 : Méthodes de contrôle des résidus d’antibiotique**

3.1. Résidus des antibiotiques .....		<b>28</b>
3.2. Nature et propriétés résidus .....		28
3.2.1. Résidus extractibles.....		28
3.2.2. Résidus non-extractibles.....		29
3.3. Facteurs de risque associés aux pratiques.....		29
3.4. Paramètres fixés pour la protection du consommateur.....		30
3.4.1. Limite maximale de résidus (L.M.R).....		31
3.4.2. Dose sans effet.....		31
3.4.3. Dose journalière admise.....		31
3.4.4. Temps d'attente.....		31
3.5. Méthodes de contrôle des résidus.....		32
3.5.1. Importance et nécessité.....		32
3.5.2. Méthodes de détection.....		33

3.5.3. Dépistage des résidus antibiotiques.....	33
3.5.3.1. Tests biologiques.....	34
A. Premi® Test.....	34
B. Méthode STAR ou méthode des 5 boîtes.....	35
C. Delvo®Test.....	35
D. Test «Rénal ».....	35
E. Testes biochimiques.....	35
F. Test des 4 boîtes : méthode officielle en Europe.....	36
3.5.3.2. Tests physico-chimiques.....	36
3.5.4. Méthodes de confirmation.....	37
3.6 .Effet de température sur les résidus .....	37
3.6.1 Stabilité des résidus de tétracycline pendant la cuisson .....	38

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre 04: Matériel & Méthodes**

4.1. Rappel sur les objectifs .....	41
4.2. Choix de l'antibiotique .....	41
4.3. Choix des températures de traitement .....	41
4.4. Matériel biologique .....	41
4.4.1. Les souches bactériennes .....	41
4.4.2. Caractéristique des souches bactériennes étudiées .....	42
4.4.2.1. Préparation de pré-culture.....	42
4.4.2.2. Coloration de Gram.....	42
4.4.2.3. Antibiogramme.....	43
4.4.3. Analyse proprement dite.....	43
4.4.3.1. Traitement thermique.....	43
4.4.3.2. Contrôle de l'effet de DMSO.....	43
4.4.3.3. Calculée la concentration.....	43

4.4.3.4. Dilution de l'OTC par DMSO.....	44
4.4.3.5. Calcul de la charge bactérienne.....	44
4.5. Antibiogramme.....	45
4.5.1. Préparation des boîtes de Pétri.....	45
4.5.2. Application des disques.....	46
4.6. Mesure de la concentration d'OTC par spectrophotométrie.....	46

## **Chapitre 05: Résultats et discussion**

5.1. Tests de confirmation.....	47
5.1.1. Coloration de Gram.....	47
5.1.2. Antibiogramme sans traitement thermique.....	48
5.2. Antibiogramme(OTC) après traitement thermique.....	50
5.2.1. Effets des traitements thermiques de l'OTC sur les bactéries testées.....	50
5.2.1.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	50
5.2.1.2. <i>Escherichia Coli</i> .....	52
5.2.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	53
5.2.1.4. <i>Staphylocoques aureus</i> .....	54
5.2.1.5. <i>Streptocoque</i> .....	54
5.3. Effets des traitements thermiques sur l'OTC.....	55

Conclusion

Références

Annexes

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure1.1</b> : Principaux modes d'action des antibiotique ( <b>Pierrick Lassalas, 2012</b> ).....	<b>04</b>
<b>Figure 2.1</b> : Principaux mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques ( <b>Olivier Meunier, 2015</b> ).....	<b>15</b>
<b>Figure2.2</b> : Illustration des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques ( <b>Van Bambeke et al., 2008</b> ).....	<b>15</b>
<b>Figure2.3</b> : Mécanismes biochimiques d'acquisition de la résistance ( <b>Ramseyer Jérémie, 2010</b> ).....	<b>20</b>
<b>Figure 4.1</b> : La dilution de l'OTC.....	<b>44</b>
<b>Figure 5.1</b> : Les souches bactériennes testées par l'OTC avant traitement.....	<b>48</b>
<b>Figure 5.2</b> : Histogramme des résultats de l'antibiogramme par (OTC) avant traitement.....	<b>49</b>
<b>Figure 5.3</b> : Courbe des résultats des zones d'inhibitions <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>50</b>
<b>Figure 5.4</b> : Courbe des résultats des zones d'inhibitions <i>d'Escherichia Coli</i> .....	<b>52</b>
<b>Figure 5.5</b> : Courbe des résultats des zones d'inhibitions <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	<b>53</b>
<b>Figure 5.6</b> : Courbe des résultats des zones d'inhibitions <i>Staphylocoques aureus</i> .....	<b>54</b>
<b>Figure 5.7</b> : Courbe des résultats des zones d'inhibitions <i>Streptocoque</i> .....	<b>54</b>
<b>Figure 5.8</b> : Histogramme des résultats d'absorbance de l'OTC après le traitement.....	<b>56</b>

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 2.1</b> : Principaux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques (Youness El Alj, 2008).....	<b>19</b>
<b>Tableau 3.1</b> : Principales classes d'antibiotiques et les risques potentiels (Epiez, 2014).....	<b>30</b>
<b>Tableau 3.2</b> : Quelques bactéries utilisées pour la détection des antibiotiques (Adel Rezgui, 2009).....	<b>33</b>
<b>Tableau 4.1</b> : Codes des souches bactériennes de référence utilisées.....	<b>42</b>
<b>Tableau 4.2</b> : les charges bactériennes.....	<b>45</b>
<b>Tableau 5.1</b> : Résultat de l'observation microscopique de la coloration de Gram.....	<b>47</b>
<b>Tableau 5.2</b> : Corrélation de Pearson entre les traitements thermiques de l'OTC et l'activité inhibitrice sur les bactéries testées.....	<b>55</b>



# INTRODUCTION GENERALE

Dès l'aube de son existence, l'homme a toujours évolué avec les bactéries et a donc subi les ravages causés par les maladies infectieuses. Au XIXe siècle, les infections bactériennes étaient la première cause de mortalité et faisaient des millions de morts (**Cheick na Cisse, 2012**).

L'utilisation des antibiotiques en clinique depuis les années 1940, constitue une étape importante dans l'histoire de la médecine. Leur usage en médecine humaine dans un but thérapeutique (**Okombe et al., 2016**) pour le traitement des infections bactériennes, mais ils sont également indiqués en médecine vétérinaire (**Mensah et al., 2014**). Que ce soit dans les élevages d'animaux de production ou pour soigner les animaux de compagnie (**Stoltz Rémi, 2008**) à des buts, thérapeutique, prophylactique, métaphylactique et comme additifs alimentaires ou promoteur de croissance. Les antibiotiques les plus utilisés sont les tétracyclines, les pénicillines et les céphalosporines administrés par voie parentérale (**Mensah et al., 2014**).

Les antibiotiques ont une place importante dans l'élevage moderne d'aujourd'hui. Leur nécessité dans l'arsenal thérapeutique et leur utilité économique est cependant indéniable (**Stoltz Rémi, 2008**) Après leur administration aux animaux, ces traitements donnent lieu à la présence des résidus dans les tissus et aliments produits par ces animaux (**O.D. Koudandé et al., 2014**) La contamination des denrées alimentaires d'origine animale par les résidus présente des problèmes tant sanitaires qu'hygiéniques pouvant affecter la santé du consommateur.

Le danger des résidus se manifeste dans les effets cumulatifs ou chroniques qui résultent de l'ingestion régulière de faibles quantités de substances toxiques (**Zebro Lamouni Habibata, 2014**) sont souvent à l'origine de potentiels risques toxicologiques pour le consommateur et de développement de bactéries résistantes aux antibiotiques vétérinaires (**Mensah et al., 2014**) en raison de problèmes de toxicité (**Valerie Gaudin, 2017**).

Le consommateur recherche, de plus en plus à l'heure actuelle, la sécurité sanitaire des aliments, et en particulier l'assurance de la qualité microbiologique et toxicologique. Cette sécurité constitue des procédures d'évaluation des risques doivent

faire comprendre leur devenir et leur dégradation pendant la transformation des aliments surtout durant la cuisson ou le stockage (**Lei et al., 2016**). Pour cette raison, les règlements sont en place pour définir les limites maximales de résidus (LMR) des antibiotiques autorisés dans les produits alimentaires.

Toutefois, les LMR applicables à la quantité de résidus dans le produit des aliments crus, sans tenir compte des changements qui se produisent au cours du traitement. Comme la plupart des aliments d'origine animale sont habituellement consommés après la cuisson ou le traitement, connaissant l'effet de différents traitements thermiques sur les résidus sont essentiels lors de l'évaluation et de l'exposition humaine (**Lei et al., 2016**).

À cet égard, notre travail a comporté une première partie, correspondant à une synthèse bibliographique dans laquelle nous avons abordé des généralités sur les différentes familles des antibiotiques et leur mode d'action, ensuite sur la résistance bactérienne aux antibiotiques et les principaux mécanismes de cette résistance, enfin les résidus des antibiotiques et les différentes techniques de détection.

Dans la deuxième partie : la démarche a débuté par l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'oxytétracycline sur des souches sensibles et résistances à cet antibiotique et ensuite le même protocole est appliqué mais après l'exposition de l'oxytétracycline à différentes températures.

**Revue  
bibliographique**

## Chapitre 1 : Généralités sur les antibiotiques

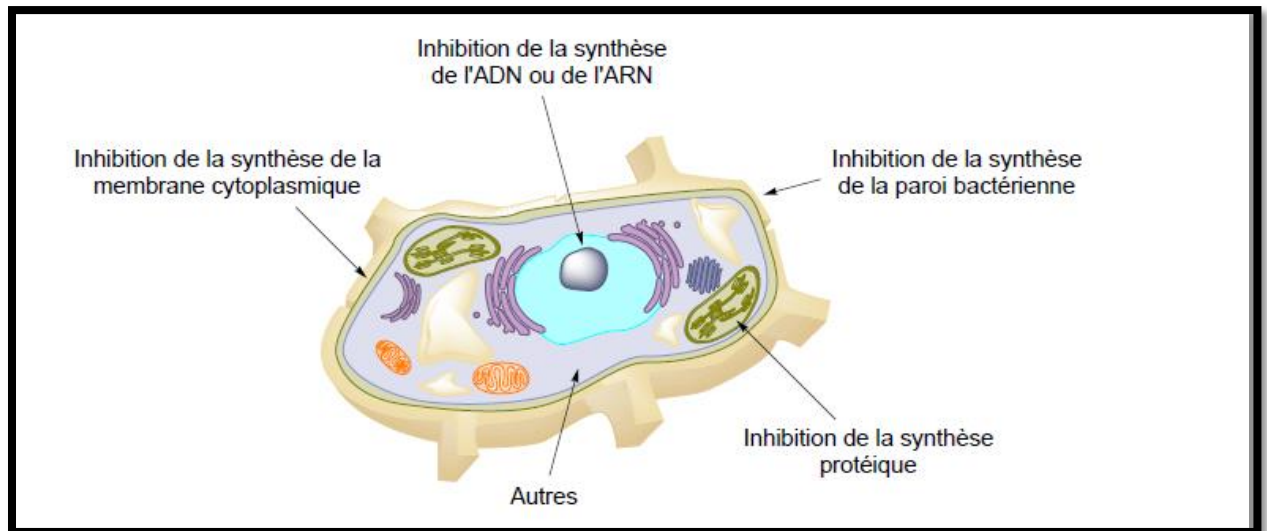
### 1.1. Introduction

Le mot antibiotique provient de deux termes Grec anti : contre, et bios : la vie (**Hazar Ziadi, 2010**). Les antibiotiques se définissent comme des molécules antibactériennes synthétiques ou naturelles (d'origine biologique) capables d'inhiber la croissance des bactéries (bactériostatiques) ou les détruire (bactéricides) .Ils ont une toxicité sélective pour les bactéries mais pas pour l'organisme cible.

Les sources principales des antibiotiques sont les champignons, mais aussi les bactéries. Il existe également des antibiotiques entièrement synthétiques (**Boultif Latifa, 2015**). Un antibiotique est donc un médicament qui a pour effet de tuer des bactéries de façon ciblée. Il se distingue d'un antiseptique qui détruit tout germe et parfois même la cellule, de manière non sélective. Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, le spectre d'action, le mécanisme d'action, etc. (**Hazar Ziadi, 2010**).

### 1.2. Classification des antibiotiques

La classification actuelle des antibiotiques est basée sur leur mode d'action, associé au site d'action. Les quatre principaux modes d'action sont : l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, de la membrane cytoplasmique, des protéines au sein du ribosome et des acides nucléiques (ADN ou ARN) (**Figure 1.1**), d'autres mécanismes d'action moins répandus ont également été identifiés, comme par exemple l'inhibition de la synthèse de l'acide folique. Mais Généralement, le mode d'action le plus souvent mis en œuvre est l'inhibition de la synthèse protéique par interaction avec le ribosome. Les antibiotiques sont classés en famille en fonction de leurs origines, nature chimique, mode d'action (**Quoc-Tuc DINH, 2012**).



**Figure 1.1** : Principaux modes d'action des antibiotique (**Pierrick Lassalas, 2012**)

### 1.2.1. $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -Lactamines représentent la classe thérapeutique la plus utilisée en médecine humaine. Cette classe thérapeutique regroupe de nombreuses molécules qui possèdent toutes un noyau bêta-lactame, associé à des cycles et des chaînes latérales variables. Ce noyau est la cible des bêta-lactamases qui l'hydrolysent, et qui rendent l'antibiotique inactif.

Les  $\beta$ -Lactamines possèdent un effet bactéricide grâce à leur inhibition la synthèse de la paroi bactérienne, les cibles des bêta lactamines sont les **PLP** (*protéines de liaison à la pénicilline*). Les PLP interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne. L'ensemble des  $\beta$ -Lactamines forme une large classe d'antibiotiques qui comprend les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de bêta-lactamase (**Bibal Delphine, 2008**).

#### A. Pénicillines

Les pénicillines naturelles sont des molécules synthétisées par certains champignons microscopiques de la famille des *Penicillium* (**Chemelle Julie, 2010**). Les pénicillines sont divisées en trois groupes : les pénicillines G, M et A. Les pénicillines G sont exclusivement active sur les germes Gram positif (*streptocoques et staphylocoques*) tandis que les pénicillines A voient leur spectre élargi aux germes

Gram négatif (*colibacilles, salmonelles*). Elles sont inactivées par des bêta lactamases, enzymes sécrétées par certaines bactéries.

### B. Céphalosporines

Les céphalosporines (céfaléxine, ceftiofur, cefquinome), très proches des pénicillines, se distinguent par leur spectre d'action plus large et par leur résistance à l'égard des bêtalactamases. (Lefebvre Nicolas, 2005).

### C. Monobactames

Ce sont des  $\beta$ -Lactames monocycliques. Les monobactames ont un seul représentant en thérapeutique anti-infectieuse. Il s'agit de l'aztréonam. Ils sont actifs sur les *Enterobacteriaceae*, les *Pseudomonas*, la plupart des cocci à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif et les anaérobies sont toujours résistantes.

## 1.2.2. Aminosides

Ces antibiotiques de la famille des aminoglycosides, sont principalement produits par *Streptomyces* ou *Micromonospora* (Lefebvre Nicolas, 2005). Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques, leur structure de base commune comporte un aminocyclitol, auquel se lient par des ponts glycosides, (ou exceptionnellement) oses (Aminata Dalla Sissoko, 2009).

Cette famille des antibiotiques possédait une activité bactéricide par l'inhibition de la synthèse protéique des bactéries (Bassirou fall, 1999) suite à leur fixation sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien (Aminata Dalla Sissoko, 2009) leur spectre est très large : *Entérobactéries, staphylocoques, Listeria, Clostridium diphtheriae, B.anthraxis, Brucelia, Pasteurella multocida, F. tukrensis*. La streptomycine demeure efficace contre *Mycobacterium tuberculosis* (Bassirou fall, 1999).

### 1.2.3. Quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, La cible des quinolones sont les ADN polymérase de type II qui assurent le surenroulement négatif de l'ADN lors de la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN (**Ramseyer Jérémie, 2010**).

On distingue les antibiotiques de : la 1<sup>ère</sup> génération : Acide nalidixique ; la 2<sup>ème</sup> génération : fluoroquinolones : Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacine et la 3<sup>ème</sup> génération : Lévofloxacine, Moxifloxacine. Ils sont très efficaces contre les bactéries entériques comme *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* et contre *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries pathogènes à Gram négatives, ainsi que les Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis* (**Sedrati Amina, 2014**).

### 1.2.4. Macrolides et apparentés

Les macrolides sont des macrolactones (**Ramseyer Jérémie, 2010**) ayant une structure lactonique géante liée à des sucres simples ou aminés. Habituellement les Macrolides divisés en vrais et apparentés (ou synergistines et lincosanides) (**Periti et al., 1992**). Les macrolides sont des antibiotiques bactériostatiques (**Lefebvre Nicolas, 2005**) qui agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur l'unité 50S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse. Leur spectre d'activité est orienté principalement vers les Gram (+), coques (*staphylocoques* et *streptocoques*) et bacilles (*Corynebacteries*, *Listeria*, *Clostridium*). (**Ramseyer Jérémie, 2010**).

### 1.2.5. Sulfamides

Les sulfamides sont des molécules de synthèse, dérivées de l'acide para-amino-benzoïque. (**Sekhri-Arafa Nedjouda, 2011**) Les sulfamides antibactériens sont des molécules bactériostatiques à large spectre qui agissent sur la synthèse bactérienne d'acides foliques. Ils sont actifs sur : les cocci à Gram positifs comme les *staphylocoques* et *streptocoques* et aussi les bacilles à Gram positifs telles que : *Listeria*, *Bacillus*

*anthracis, Clostridium*. Les bacilles à Gram négatifs : *entérobactéries* (*Salmonella* et *Proteus* sont inconstamment sensibles), (**Fanny Routaboul, 2011**).

### 1.2.6. Tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques isolés par la plupart de souches de *Streptomyces*, elles ont été découvertes pour la première fois en **1945** par **Benjamin Duggar**, elles sont utilisées dans le contrôle des infections bactériennes chez les animaux et chez les humains (**Hazar Ziadi, 2010**) Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à très large spectre, elles voient leur usage limité aujourd'hui par l'émergence de résistances (**Van Bambeke et al., 2008**). Les cyclines de cette famille ont été divisées en deux : cyclines naturelles (Chlortétracycline et Tétracycline) et les cyclines hémi-synthétiques (Oxytétracycline, Doxycycline et Minocycline).

#### 1.2.6.1. Structure chimique

Les tétracyclines possèdent un caractère amphipathique par la présence de cycles lipophiles d'une part et de substituant hydrophiles d'autre part.

#### 1.2.6.2. Mode d'action

Les tétracyclines sont exclusivement bactériostatiques (**Michel Briand, 2002**). Elles inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la structure cible, un site localisé sur la sous-unité 30S des ribosomes pour lequel elles présentent une grande affinité. Elles perturbent ainsi l'interaction codon-anticodon entre l'ARNt et l'ARNm ce qui bloque la phase d'élongation. Les tétracyclines agissent donc au stade de la traduction protéique. (**Boultif Latifa, 2015**).

#### 1.2.6.3. Spectre d'activité

L'action inhibitrice des tétracyclines sur la synthèse protéique n'est limitée que par sa capacité à rejoindre sa cible. Étant donné la large distribution de transporteurs dans le monde bactérien, ou même parasitaire, ces antibiotiques présentent un spectre en principe extrêmement étendu. Les tétracyclines sont donc actives vis-à-vis des coques et bacilles à Gram positif, des coques et bacilles à Gram négatif, y compris des germes intracellulaires, ainsi que des anaérobies. Des espèces bactériennes possédant



un mécanisme d'efflux constitutif (*Pseudomonas*, *Proteus*) et des germes atypiques (Van Bambeke *et al.*, 2008).

#### 1.2.6.4. Mécanisme de résistance

Il existe deux types de résistance aux tétracyclines. La première est liée à un plasmide, elle entraîne un efflux actif des tétracyclines grâce à des protéines (T) et situées dans la membrane interne. La seconde résistance entraîne une protection des sites actifs du ribosome par d'autres protéines (T) et. La protéine (T) et(K) est une des protéines qui entraîne l'expulsion des tétracyclines et les protéines (T) et(O) ou (T) et(M) vont elles, protéger les sites actifs ribosomiaux (Michel Briand, 2002).

##### A. Oxytétracycline

Est un antibactérien naturel de la famille des tétracyclines, isolé en 1948 par Finlay à partir d'échantillons de terre, produite par un champignon inférieur de l'ordre des *Actinomycta* les (*Streptomycesrimosus*), elle possède une activité bactériostatique à spectre large sur les bactéries à Gram positif et négatif. L'oxytétracycline se caractérise par : un squelette de base dérivé du naphtacène qui résulte de la condensation en ligne de quatre cycles insaturés à six chaînons ; une structure très oxygénée comportant notamment : un noyau phénol, un enchaînement  $\beta$ -dicétophénolique, structure à doubles liaisons conjuguées comprenant un hydroxyle phénolique et énoïque et 2 fonctions cétones, un hydroxyle énoïque ; une fonction amine tertiaire basique (groupement diméthylamine) et une fonction carboxamide (Raphaél Delépée, 2009).

##### A.1. Caractéristiques et propriétés physiques

L'Oxytétracycline est une poudre cristalline jaune de masse molaire 460,4 g et de point de fusion 182°C. Sous sa forme non ionisée, elle est peu soluble dans l'eau. Sous sa forme ionisée, elle est soluble dans l'eau et les alcools mais insoluble dans les solvants organiques. La présence de plusieurs carbones asymétriques confère à l'oxytétracycline une action sur la lumière polarisée. Le pouvoir rotatoire spécifique de l'oxytétracycline est de -196 ° dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L (Raphaél Delépée, 2009).

## A.2. Propriétés chimiques

La présence d'un groupement diméthylamine en position 4 est à l'origine du caractère basique de l'oxytétracycline. Par contre, les fonctions cétones et alcools induisent une acidité faible. L'oxytétracycline possède donc trois pKa à 3, 3 (fonction énolique, carboxamide et cétone du cycle A), 7,3 (enchaînement dicétophénolique) et 9,1 (groupement diméthylamine). En milieu aqueux ou polaire, l'oxytétracycline manifeste un caractère amphotère. Le point isoélectrique se situe à un pH de 5,0. La salification de la fonction amine tertiaire permet la préparation de sels tels que les chlorhydrates. Ces sels sont facilement dissociables donc hydrosolubles. Les solutions de ces sels sont acides et facilement hydrolysables, les rendant ainsi instables. **(Raphaél Delépée, 2009).**

## A.3. Activité antibactérienne

L'oxytétracycline est un antibiotique bactériostatique inhibant la protéosynthèse bactérienne dont le spectre d'activité s'étend des germes Gram positif aux germes Gram négatif. Elle est également active sur les bactéries anaérobies, les mycoplasmes, les rickettsies, les Chlamydiae et les leptospires. Elle possède enfin une activité sur les amibes, les coccidies ainsi que sur histomonas et contre les bactéries pathogènes à Gram négatif des genres *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Haemophilus*. L'oxytétracycline est également active contre quelques bactéries pathogènes à Gram positif des genres *Renibacterium*, *Streptococcus* et *Clostridium*. Par ailleurs, l'activité antibactérienne de l'oxytétracycline contre *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* et *Yersinia ruckeri* **(Raphaél Delépée, 2009).**

## A.4. Mode d'action

Le mode d'action principal réside dans l'inhibition de la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminoacyl-ARNt à la sous-unité 30 S du ribosome bactérien. L'oxytétracycline a également pour action l'inhibition de nombreux systèmes enzymatiques microbiens par chélation des cations des métaux bivalents.

## B. Chlortétracycline

Cholrtétracycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines, bactériostatique à large spectre, a été découvert en 1948 à partir de *Streptomyces aureofaciens* (Aminata Dalla Sissoko,2009)elle agit sur les germes à Gram négatif et à Gram positif ainsi que sur les mycoplasmes en inhibant la synthèse protéique bactérienne.

### C. Tétracycline

Est un antibiotique bactériostatique, chef de file de la famille des tétracyclines. Elle agit sur : *Brucella, Pasteurella, Chlamydia, Rickettsia, Listeria, Leptospira, Haemophilus*, etc. Elle agit en inhibant la synthèse protéique bactérienne et en inhibant de nombreux systèmes enzymatiques microbiens par chélation des cations des métaux bivalents (Lefebvre Nicolas, 2005).

### D. Doxycycline

Ce médicament est un antibiotique de la famille des cyclines. Il est indiqué habituellement dans le traitement de certaines infections à germes sensibles à la doxycycline :*Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia, Streptococcus pyogenes, Streptooccusagalacticae*, etc.(Afssa , 2006).

### E. Minocycline

Cette molécule est un dérivé tétracyclinique semi-synthétique dont l'activité bactériostatique est basée sur l'inhibition de la synthèse bactérienne des protéines (Eleni Siop, 2012), le spectre est large et comprend *les staphylocoques, les streptocoques, meningocoques, gonocoques, Brucella, Pasteurella, Mycoplasmapneumoniae,Chlamydia pneumoniae, Listeria, Rickettsia, Treponema, Vibriocholerae*( Jean Claude Kiouba,2002).

## 1.3. Usage des antibiotiques

L'importance des antibiotiques est capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces molécules sont employées dans de nombreux domaines comme principal moyen de lutte contre les infections bactériennes, en particulier en médecine humaine mais également en médecine vétérinaire, que ce soit dans les élevages

d'animaux de production ou pour soigner les animaux de compagnie et pour maîtriser certaines maladies bactériennes présentes sur les végétaux . (Afssa, 2006).

Les antibiotiques sont tout d'abord utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Il réduit l'excrétion bactérienne, permettant dans certains cas d'obtenir une guérison bactériologique et, lors d'infection zoonotique, il peut éviter la contamination humaine (**Frank Dupleix Khalen Woumbe, 2013**)

Utilisation en métaphylaxie Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentant pas encore de signes cliniques (sains ou en 26 incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes (**Sinaly Dosso, 2014**)

L'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs est très limité actuellement. Ces « antibiotiques régulateurs de flore » (ARF) ou « antibiotiques promoteurs de croissance » (AGP pour « antibiotic growth promoters ») sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et en vue d'améliorer la croissance des animaux par un effet régulateur au niveau de la flore intestinale. Ces antibiotiques sont tous des agents chimiothérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur pour la médecine humaine. (**Sinaly Dosso, 2014**)

Usage prophylactique: les antibiotiques peuvent parfois être administrés à des périodes critiques de la vie des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue. Dans la filière porcine, des antibiotiques peuvent être donnés à titre préventif au moment du sevrage qui constitue un stress important pour les animaux. L'antibioprophylaxie est aussi utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les Infections bactériennes (**Bibbal Delphine, 2008**)

## **1.4. Problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans l'aliment**

Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques sont d'ordre sanitaire et technologique. Il faut toutefois distinguer la notion d'inhibiteurs qui correspond à un problème technologique et la notion de résidus qui correspond à un problème de santé publique (**Boultif Latifa, 2015**).

### **1.4.1. Problèmes sanitaires**

Les réactions allergiques ont été observées chez des personnes déjà sensibilisées, suite à la consommation de denrées d'origine animale. D'autant plus qu'ils réunissent plusieurs conditions pouvant donner lieu à des manifestations de type allergique. Les antibiotiques les plus souvent incriminés sont les pénicillines, suivis des sulfamides et, dans une moindre mesure les tétracyclines ou l'aspiramycine. (**Boultif Latifa, 2015**).

### **1.4.2. Problèmes toxiques**

#### **1.4.2.1. Toxicité directe**

La toxicité directe des résidus d'antibiotiques est assez difficile à mettre en évidence car il s'agit en générale de toxicité chronique. Certains scientifiques évoquent alors une possible toxicité hépatique (**Sinaly Dosso, 2014**)

#### **1.4.2.2. Risques cancérogènes**

Certains antibiotiques ont des propriétés carcinogènes connues. En effet, les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir un effet carcinogène sur le long terme, suite à une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. Ces antibiotiques sont alors interdits d'utilisation chez les animaux de production. C'est le cas des Nitrofuranes. Ces derniers, incluant la nitrofurazone, sont des antibiotiques qui sont utilisés en médecine humaine pendant une courte durée chez les patients. Ces molécules sont bien connues comme carcinogènes génotoxiques. (**Sinaly Dosso, 2014**)

#### **1.4.2.3. Risques bactériologiques**

Le risque bactériologique lié à la consommation de denrées alimentaires contenant des résidus d'antibiotiques peut être attribué à deux phénomènes : la

modification de la flore digestive pouvant entraîner des troubles et une symptomatologie indésirables, et la sélection chez l'homme de souches de germes pathogènes ou opportunistes tels que *Pseudomonas*, les entérobactéries, les entérocoques, les staphylocoques et les levures, diminuant ainsi l'immunité naturelle. Ce déficit immunitaire peut conduire à certains problèmes sanitaires tels qu'une atteinte du système nerveux, des os, des dents (coloration des dents en jaune), du foie, du sang, ainsi que l'apparition de bactéries mutantes résistantes aux antibiotiques, engendrant des échecs thérapeutiques. (Boultif Latifa, 2015).

### 1.4.3. Problèmes technologiques

Les fabrications les plus sensibles sont celles où interviennent les ferments lactiques et les germes d'aromatisation types : yaourt, fromages à caillage acide et à caillage mixte, crème et beurre maturés (Boultif Latifa, 2015).

### 1.4.4 Antibiorésistance

La présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments peut constituer des risques pour les consommateurs ; risques parmi lesquels on note la sélection de bactéries pathogènes antibiorésistantes. D'une manière générale, les résidus antibiotiques, tant qu'ils ne dépassent pas les niveaux légaux, n'exercent pas une pression suffisante pour sélectionner des souches résistantes au sein de la flore intestinale humaine (Sinaly Dosso, 2014).

## Chapitre 2 : Résistance bactérienne aux antibiotiques

### 2.1. Introduction

L'introduction des antibiotiques en thérapeutique a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Malheureusement, nous sommes aujourd'hui rattrapés par la résistance aux antibiotiques. Effectivement, depuis ces trente dernières années, l'antibiorésistance préoccupe bon nombre de cliniciens. Progressivement, les infections sont devenues difficiles à traiter et nous assistons de plus en plus à des impasses thérapeutiques (**Jean Luc Aboya Moroh, 2013**).

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration plus élevée de cet antibiotique que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce (**Zomahoun Carène Irédé Nadia Prisca, 2004**). La résistance bactérienne aux antibiotiques est un facteur compliquant l'action de ces antibiotiques. Il en existe 3 modes (**figure 2.1 & figure 2.2**) :

- La modification de la cible : la cible de l'antibiotique est modifiée et l'antibiotique ne peut plus s'y fixer ;
- L'inactivation enzymatique : l'antibiotique est modifié par la production d'une enzyme bactérienne et ne reconnaît plus sa cible ;
- L'imperméabilité : c'est la diminution de la pénétration et l'efflux actif par des pompes plus ou moins spécifiques.

Ces mécanismes sont responsables de *résistances naturelles* : caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne, elle est toujours transmissible à la descendance et de *résistances acquises* : caractéristique ne s'appliquant qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne, variable dans le temps (**Lai Michel, 2013**).

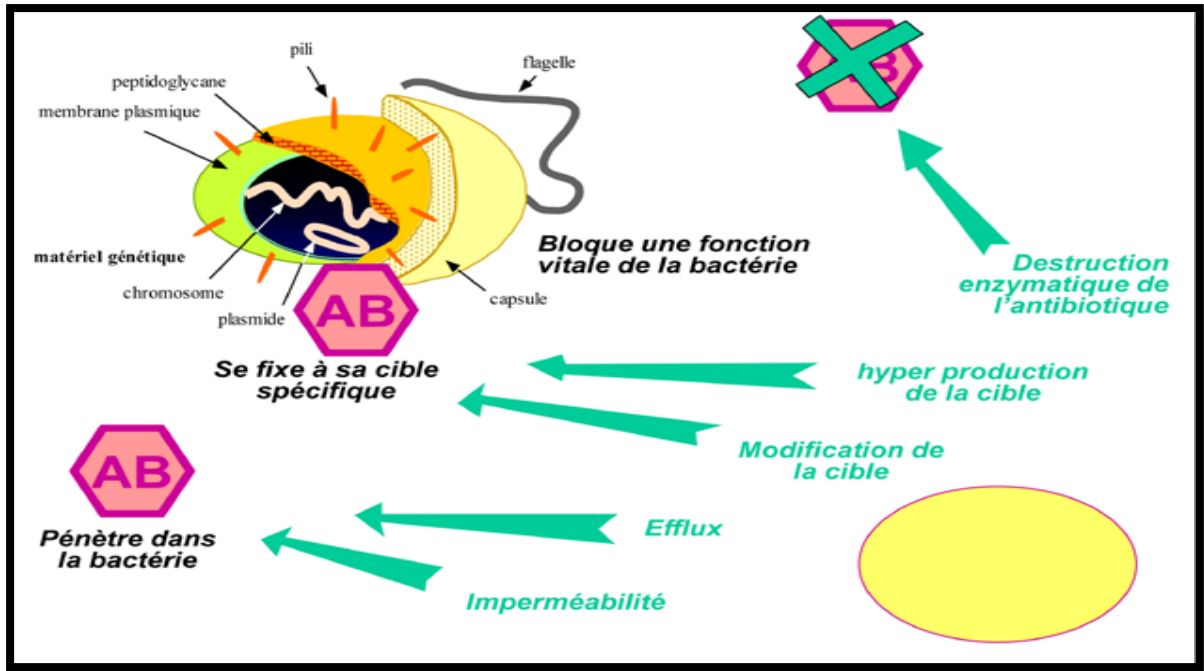


Figure 2.1 : Principaux mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (Olivier Meunier, 2015)

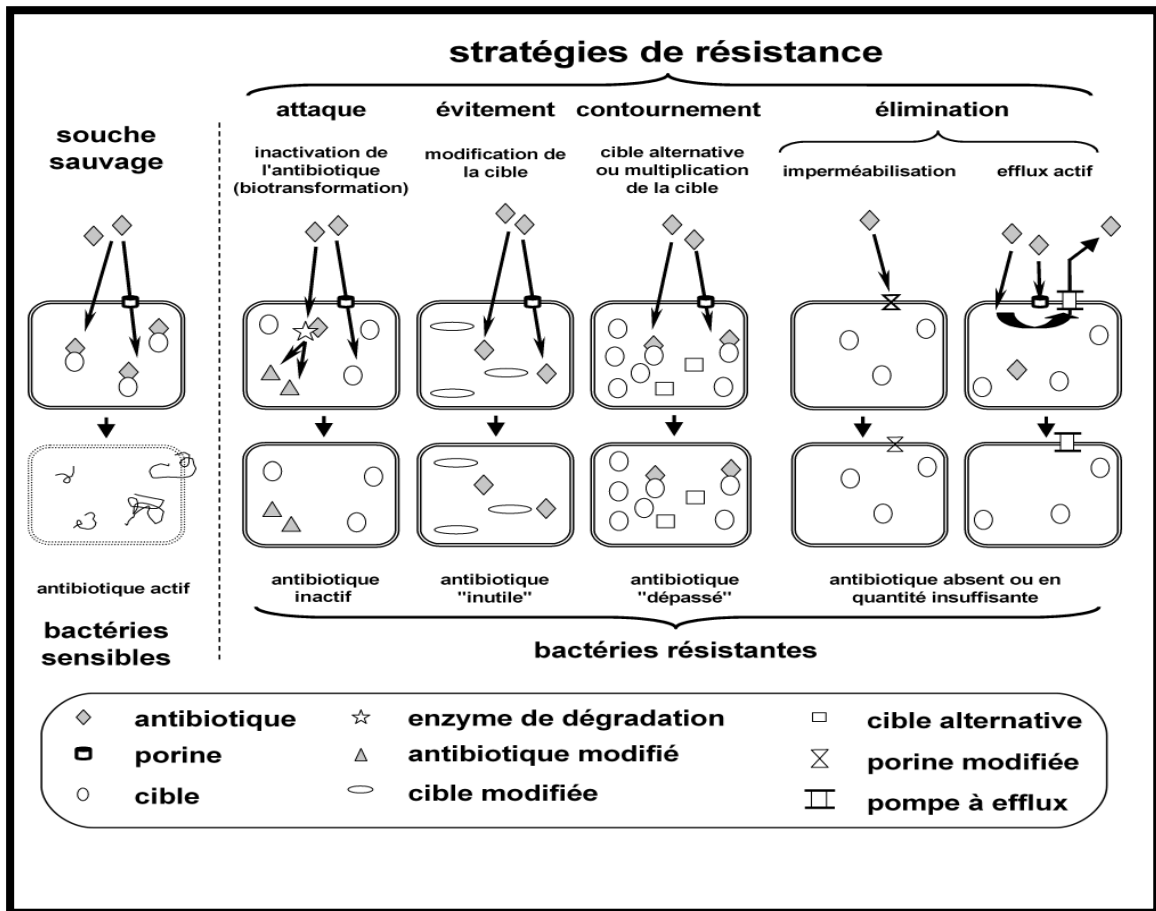


Figure 2.2 : Illustration des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Van Bambeke et al., 2008).



## 2.2. Résistance naturelle

Toutes les souches appartenant à la même espèce sont résistantes à un même antibiotique. Cette résistance définit le spectre naturel d'activité d'un antibiotique. D'un point de vue génétique la résistance naturelle est d'origine chromosomique (**El Brahemi Redouane, 2013**). *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'amoxicilline, ampicilline et à laticarcilline, grâce à une  $\beta$ -lactamase chromosomique naturelle. Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies (**Sekhri-Arafa Nedjoua, 2011**).

## 2.3. Résistance acquise

Elle existe grâce à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype bien précis de résistance, différent du phénotype sauvage, caractérisant les souches n'ayant pas acquis ce mécanisme. La résistance acquise a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était faible.

Ultérieurement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes et on constate, quotidiennement, que de très nombreuses souches ne se comportent pas à l'égard des antibiotiques conformément à ce que les spectres d'activité permettraient de le supposer. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques (**Sekhri-Arafa Nedjoua, 2011**),

### 2.3.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le mécanisme de la résistance est fonction d'une information portée par le code génétique de la bactérie. Le support de cette information peut être le chromosome bactérien, un plasmide ou un élément génétique transposable (ou transposons). L'acquisition d'une résistance est due soit à la mutation d'un gène existant, soit à l'acquisition d'un nouveau gène (**Bassirou Fall, 1999**).

### 2.3.1.1 Résistance chromosomique

Elle ne concerne que 10% des résistances acquises. La résistance chromosomique résulte d'une mutation dont elle en présente tous les caractères (**Sekhri Arafa Nedjoua, 2011**), elles sont:

- **Spontanées:** elles existent avant l'utilisation d'antibiotique et ne sont donc pas provoquées par la présence d'antibiotique ;
- **Stables :** elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien ;
- **Spécifiques :** elles ne concernent qu'un seul antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques. Dans ce cas, la résistance à un antibiotique peut aboutir à une résistance croisée pour des antibiotiques appartenant à une même famille. (**Zomahoun Carène Irédé Nadia Prisca, 2004**).

### 2.3.1.2 Résistance extra chromosomique

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance: Les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégrons. Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bactériophages) (**Alpha Amadou Diallo, 2013**)

La résistance plasmidique concerne de nombreuses familles d'antibiotiques et de bactéries. Beaucoup de plasmides sont le support de plusieurs gènes de résistance. L'utilisation d'une molécule antibiotique sélectionne des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques (co-sélection) et les souches qui acquièrent ces éléments sont multi résistantes (résistance associée). De plus, les plasmides conjugatifs ou mobilisables peuvent être transférés horizontalement par conjugaison, parfois entre des espèces phylo génétiquement très éloignées (ce mode de transfert a été observé de bactéries à Gram positif vers des bactéries à Gram négatif). Bien que les plasmides ne se maintiennent pas obligatoirement de façon stable dans la cellule receveuse, ces caractéristiques expliquent la large diffusion de la résistance plasmidique dans les populations bactériennes (**Ramseyer Jérémie, 2009**).

### A. Transposons

Ce sont des fragments d'ADN, capable de changer sa localisation dans le génome sans jamais apparaître à l'état libre. Ils codent pour les déterminants de la transposition et ceux d'autres fonctions telles que la résistance aux antibiotiques en s'intégrant soit dans le chromosome soit dans le plasmide, en allant de l'un à l'autre (**Mehdi Saadaoui, 2008**). Les transposons conjugatifs peuvent être transférés horizontalement par conjugaison. C'est un support génétique de ce type qui expliquerait la large diffusion de la résistance aux tétracyclines (**Ramseyer Jérémie, 2009**).

### B. Intégrons

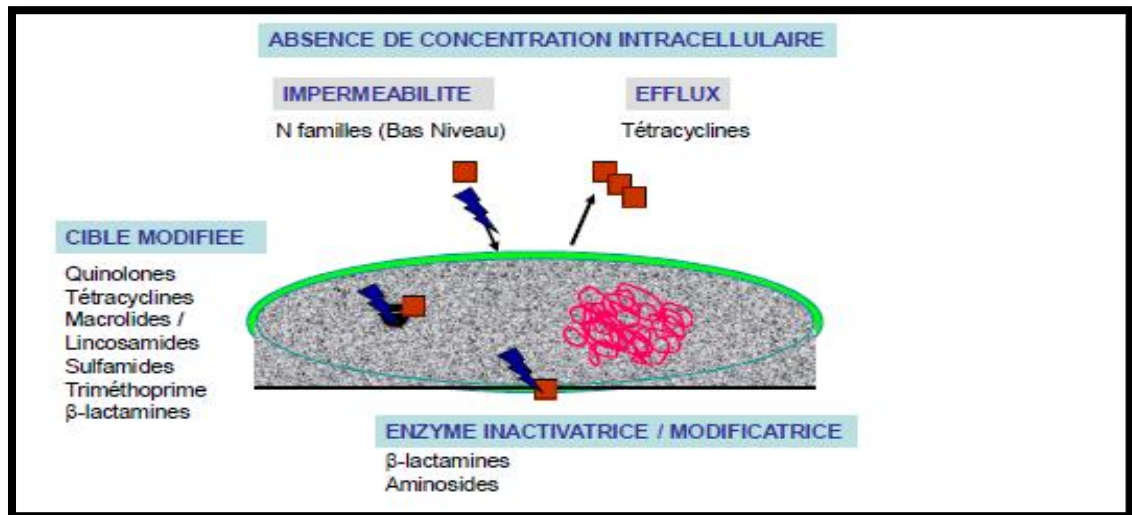
Ces éléments sont plus fréquemment rencontrés chez les bactéries à Gram négatif. Ce sont des systèmes de recombinaisons qui peuvent concentrer l'expression de plusieurs déterminants génétiques de résistance en amont d'un seul et même promoteur. Il a été reporté qu'ils intervenaient par exemple pour la dissémination des résistances aux sulfonamides et à la streptomycine (**Bernard Rémi, 2009**).

**Tableau 2.1 : Principaux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques  
(Youness El Alj, 2008)**

Type de résistance	Mécanismes de résistance
Altération de la cible (aminosides (streptomycine, spectinomycine) ; b-lactamines ; macrolides-lincosamides-streptogramines, B-quinolones ; rifampicine ; sulfamides ; tétracyclines ; triméthoprimé ; glycopeptides).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altération des protéines ribosomales</li> <li>- Altération ou nouvelle PLP</li> <li>- méthylation de l'ARN ribosomal</li> <li>- altération de la topo-isomérase II et IV</li> <li>- altération de l'ARN-polymérase</li> <li>- DHPS insensible</li> <li>- protection ribosomale</li> <li>- DHFR insensible</li> <li>- modification de la structure du précurseur du peptidoglycane</li> </ul>
Détoxification enzymatique (aminosides ; -b-lactamines ; chloramphénicol ; macrolides ; lincosamide ;streptogramines A, B).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- acétyl transférases, adénylyl-transférases,phosphotransférases</li> <li>- b-lactamases</li> <li>- acétyltransférases</li> <li>- estérases, phosphotransférases</li> <li>- nucléotidyltransférases - acétyltransférases, hydrolases</li> </ul>
Modification de la perméabilité (b-lactamines, quinolones, chloramphénicol, tétracyclines,triméthoprimé, sulfamides, polymyxines ; érythromycine, lincosamides, tétracyclines, quinolones).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- altérations des protéines de membranes externes (porines)</li> <li>- efflux actif, nouveau système de transport membranaire</li> </ul>
ARN : acide ribonucléique ; PLP : protéines liant la pénicilline ; DHFR : dihydrofolate réductase ; DHPS : dihydroptéroate synthétase.	

### 2.3.2 Mécanismes biochimiques de résistance acquise

Qu'ils soient d'origine extra-chromosomique ou inscrits dans le chromosome bactérien, ces mécanismes sont nombreux. Plusieurs mécanismes sont souvent impliqués simultanément dans la résistance aux antibiotiques. (Sophie Ziai, 2014).



**Figure 2.3** : Mécanismes biochimiques d'acquisition de la résistance (Ramseyer Jérémie, 2010)

#### 2.3.2.1 Mécanismes d'inactivations enzymatiques de l'antibiotique

Ce mécanisme est le plus fréquent et concerne toutes les classes majeures d'antibiotiques. Des enzymes, produites par les bactéries, inactivent l'antibiotique en le modifiant ou en l'hydrolysant pour empêcher son interaction avec la cible. C'est le principal mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides. La résistance est le plus souvent semi-croisée du fait, soit des variations de l'affinité de chaque enzyme pour les différentes molécules de la famille ( $\beta$ -lactamases), soit de la présence ou de l'absence des radicaux cibles (enzymes modificatrices des aminosides) (Sophie Ziai, 2014).

La modification chimique ou l'inactivation enzymatique se fait en présence d'oxygène et de NADPH en changeant chimiquement la tétracycline. Les protéines encodées par les gènes tet (X), tet (34) et tet (37) sont les seules connues qui utilisent ce mécanisme de résistance (Mélanie Trudel, 2015).

## A. Bêtalactamases

Les bactéries résistantes élaborent les bêtalactamases qui sont des enzymes qui agissent sur la structure de l'antibiotique par ouverture du cycle bêta lactame. Ainsi ces enzymes hydrolysent les bêtalactamines.

Parmi ces bêtalactamases, on peut citer principalement les pénicillinases (qui détruisent les pénicillines) et les céphalosporinases (qui détruisent les céphalosporines). Les pénicillinases ont pour substrat préférentiel les pénicillines G, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. **(Zomahoun Carène Irédé Nadia Prisca, 2004).**

### A.1. Pénicillinases

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération. Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant, on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase: SHV-I dont le support génétique est le chromosome. Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celles de *S. aureus*. Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, *αXA*, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées **(Nafissatou Dia, 1998)**

### A.2. Céphalosporinases

Pour les céphalosporinases elles sont naturellement chromosomiques chez certaines espèces d'entérobactéries, comme *Enterobacter* et *Serratia*, elles entraînent la résistance à amp et C1G, quand elles sont déréprimées, la résistance s'étend aux C3G. On décrit depuis quelques années un transfert plasmidique de ces céphalosporinases chez *K.pneumoniae* la rendant là aussi résistante aux β-lactamines y compris aux C3G **(Sekhri Arafa Nedjouda ,2011)**

## B. Enzymes inactivant les aminosides

L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de résistance le plus souvent observé. Il permet d'expliquer la résistance de plus de 95 % des souches d'entérobactéries résistantes aux aminosides, de 95 % des souches d'*Acinetobacterspp.* De 95 % des souches de bactéries à Gram positif et de 50 % des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Tous les aminosides possèdent des groupements aminés et des groupements hydroxyles nécessaires à leur activité et ces groupements peuvent être la cible de trois classes d'enzymes : les acétyltransférases catalysent l'acétylation des groupements aminés ; les nucléotidyltransférases ou O- adénylyl (ANT ou AAD) agissent par adénylation des groupements hydroxyles ; les phosphotransférases transfèrent un groupement phosphate sur les groupements hydroxy les (Mehdi Saadaoui, 2008).

## C. Inactivation des Quinolones

Quinolones Pendant longtemps la résistance aux quinolones était considérée purement chromosomique, mais les études récentes montrent qu'elle peut-être aussi plasmidique. La résistance plasmidique est décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K.pneumoniae* hébergeant un plasmide codant pour une protéine Qnr A, protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Deux autres 62 mécanismes de résistance plasmidique sont rapportés récemment: inactivation des quinolones par l'acétyltransférase AAC (6')-Ib-cr et dernièrement, excrétion active des fluoroquinolones via la pompe d'efflux QepA, Il n'existe pas de critères phénotypiques sur un antibiogramme permettant de distinguer les mécanismes de résistance chromosomiques et plasmidiques aux quinolones. (Sekhri Arafa Nedjoudj, 2011).

### 2.3.2.2 Modification de la pénétration des antibiotiques

Pour atteindre leur cible, certains antibiotiques doivent traverser la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif et la paroi chez les bactéries à Gram positif. Ainsi, il existe des mécanismes de résistance modifiant la perméabilité de ces différentes barrières et empêchant ainsi la pénétration de l'antibiotique jusqu'à sa cible. Chez les bactéries à Gram négatif, la modification du lipide A par ajout d'une chaîne acylée

supplémentaire entraîne une rigidification de la membrane externe et donc une diminution de sa perméabilité

Les porines, présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif, sont elles aussi utilisées pour empêcher la pénétration de l'antibiotique. En effet, ces porines s'ouvrent pour permettre des échanges de nutriments avec le milieu extérieur, mais cette ouverture permet à certains antibiotiques, comme les  $\beta$ -lactames, de franchir cette membrane et d'atteindre leur cible. Ainsi, les souches de *P.aeruginosa* ou de *Klebsiella pneumoniae* ayant perdu les gènes codant pour certaines de ces porines deviennent hautement résistantes aux  $\beta$ -lactames. **(Stéphanie Coumes Florens, 2011).**

### 2.3.2.3 Résistance par mécanisme d'efflux actif

Ce type de résistance est largement répandu chez les bacilles Gram négatifs. Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une sur-expression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques. Ainsi, la mutation des gènes *mar RAB* d'*Escherichia coli* entraîne une résistance aux quinolones, au chloramphénicol et aux tétracyclines.

Une acquisition de gènes peut être à l'origine de systèmes d'efflux spécifiques. Contrairement aux systèmes d'efflux multi-drogues, les systèmes d'efflux spécifiques ne permettent que l'exportation de molécules apparentées.

Le Premier exemple connu de résistance acquise par efflux transmembranaire spécifique est celui des tétracyclines. Des transposons (Tn 10 et Tn 1721) codent pour des protéines (protéines Tet) qui exportent les tétracyclines à travers la membrane cytoplasmique. Selon les protéines Tet synthétisées, la résistance concerne toutes les tétracyclines sauf la minocycline ou toutes les tétracyclines y compris la minocycline. **(Mehdi Saadaoui, 2008)**



### 2.3.2.4 Résistance par modification ou substitution de la cible

Une troisième stratégie afin de contrer l'effet d'un antibiotique est la modification de la cible de celui-ci. En effet, la présence de mutations peut modifier le site actif de la cible de l'antibiotique et ainsi empêcher sa liaison. La résistance aux  $\beta$ -lactamines est le résultat de mutations au niveau des PLPs (100). De plus, la résistance aux fluoroquinolones est médiée par l'acquisition de mutations dans les gènes codant pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, qui sont les cibles des fluoroquinolones. Également, une modification chimique de la cible peut causer la résistance en empêchant l'antibiotique de s'y lier. Par exemple, la méthylation de l'ARNr 23S au site de liaison des macrolides par une ARN méthyltransférase peut causer la résistance à cette famille. (**Andréanne Lupien, 2015**).

#### **EXEMPLE :** Modifications des cibles des sulfamides et du triméthoprime

La substitution de cible est un des mécanismes de résistance observés avec les sulfamides et le triméthoprime. Il résulte de l'acquisition de plasmides codant pour une dihydroptéroate synthétase ou une dihydrofolate réductase, ayant un rôle physiologique identique à celui des enzymes codées par le chromosome mais insensibles à l'agent antibactérien. Ces bactéries produisent donc des enzymes chromosomiques sensibles et des enzymes plasmidiques résistantes. Une modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase ou de la dihydrofolate réductase confère, respectivement, une résistance aux sulfamides ou au triméthoprime. (**Sekhri Arafa Nedjoua, 2011**).

#### **A. Modifications des PLP**

Les PLP sont des enzymes qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane. La fixation des bêtalactamines inactive ces enzymes entraînant ainsi le blocage de la synthèse du peptidoglycane. Ainsi la bactérie est donc privée de paroi. Ce sont des résistances mutationnelles (*staphylocoques*, *entérocoques*) ou acquises par transformation (pneumocoques). (**Zomahoun Carène Irédé Nadia Prisca, 2004**).

## B. Modification de la cible ribosomiale

Les ribosomes sont le lieu des synthèses protéiques. Ils peuvent être altérés dans leur structure et leur fonctionnement par la fixation d'un antibiotique. Une modification de la cible ribosomiale acquise par mutation diminue l'affinité du site de fixation de l'antibiotique et rend la bactérie résistante. Ce mécanisme est responsable de résistances aux tétracyclines, aux macrolides et lincosamides, aux phénicolés, à la fucidine et plus rarement aux aminosides (**Sophie Ziai , 2014**). Ces mutations ont été caractérisées chez *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, un autre type de mutation est impliqué dans la résistance à la streptomycine. Il s'agit d'une mutation dans le gène *rrs*, codant pour l'ARNr 16S, et qui a pour conséquence d'altérer la fixation de la streptomycine sur les ribosomes. (**Sibylle Bevilacqua, 2011**)

## C. Altération de la synthèse des acides nucléiques

L'ADN gyrase est une enzyme essentielle pour la réplication de l'ADN bactérien. En paralysant son activité, les antibiotiques de la famille des quinolones ont un effet bactéricide. Des mutations peuvent conduire à la production d'enzymes modifiées insensibles à ces antibiotiques. L'ARN polymérase (transcriptase) est nécessaire à la synthèse des ARN messagers. Les rifamycines bloquent l'action de cette enzyme. Les résistances acquises par mutation sont dues à L'acide tétrahydrofolique est un coenzyme indispensable à la synthèse des acides nucléiques. Ces résistances sont acquises par mutation ou codées par des plasmides ou des transposons. (**Sophie Ziai, 2014**).

Une substitution de l'acide aminé 447 d'*Escherichia coli* ou 458 de *Staphylococcus aureus* est observée chez des souches résistantes à l'acide nalidixique, à l'acide oxolinique et à la fluméquine mais sensibles à l'acide pipémidique et aux fluoroquinolones. L'association d'une mutation dans le gène *gyrA* et dans le gène *gyrB* a été observée chez une souche de *Staphylococcus aureus* (**Sibylle Bevilacqua, 2011**).

### D. Modification du précurseur du peptidoglycane

Les glycopeptides (vancomycine, et teicoplanine) ont une affinité pour les précurseurs du peptidoglycane comportant le dipeptide D-alanyl-D-alanine. Les cibles potentielles sont donc soit intra cytoplasmiques soit situées au niveau de la paroi en formation. Ces cibles ne sont pas toutes atteintes, car elles ne sont pas toutes accessibles aux glycopeptides. Chez les bactéries à Gram positif, ces antibiotiques diffusent librement à travers les mailles du peptidoglycane. En revanche, ils ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique et leur action s'exerce sur la paroi en formation. Grâce à des liaisons hydrogènes, les glycopeptides forment un complexe avec les dipeptides D-alanyl-D-alanine présents dans la paroi en formation. Du fait de l'encombrement stérique induit par la présence de ces grosses molécules, il y a inhibition des transglycosylases et des transpeptidases.

L'élongation de la paroi et la croissance bactérienne sont inhibées (effet bactériostatique), puis d'autres mécanismes doivent intervenir, car les glycopeptides ont un effet bactéricide lent. Ce mode de résistance est codé par des gènes qui sont présents sur des transposons localisés sur le chromosome ou sur un plasmide autotransférable (El Brahmî Redouane, 2013).

### E. Modification enzymatique de la cible

Ce mécanisme est impliqué dans la résistance aux macrolides. Il est lié à la production de méthylases dont les gènes sont plasmidiques ou chromosomiques. Cette enzyme va méthyler la sous-unité 50s des ribosomes, et ainsi empêcher les macrolides de s'y fixer. Ce phénomène s'observe chez des bactéries à Gram + (*Staphylocoques*). La production de transcriptase modifiée (Sophie Ziai, 2014).

## 2.4 Facteurs favorisant l'antibiorésistance

### 2.4.1 Usage humain des antibiotiques

Avec l'augmentation de l'utilisation et du mésusage des antibiotiques, la résistance concerne maintenant chaque bactérie pathogène connue. Certaines résistances posent plus de problèmes. En milieu hospitalier les causes des infections diverses (pulmonaires, osseuses, sepsis) (Sophie Ziai, 2014).

## 2.4.2 Usage vétérinaire des antibiotiques

### 2.4.2.1 Additifs alimentaires

L'utilisation des additifs, par l'utilisation d'antibiotiques à des concentrations inférieures à la CMI pendant parfois de très longues durées, a été incriminée dans la sélection de résistances bactériennes. Diverses études menées dans les pays nordiques sur la présence de souches résistantes à l'avilamycine (antibiotique largement utilisé comme facteur de croissance) de *Enterococcus faecium* isolées chez des volailles ont tendu à démontrer que celles-ci étaient plus fréquemment retrouvées chez les animaux ayant reçu cet antibiotique sous forme d'additif au cours de leur vie (**Marie Claude Chatellet, 2007**).

## 2.4.3 Usage agricole des antibiotiques

### 2.4.3.1 . Protection des cultures et plantes transgéniques

Dans ce domaine, l'apparition de résistance chez les bactéries pathogènes pour les plantes a été constatée très tôt. Au-delà des effets sur la production elle-même et la lutte contre les ravageurs, ce phénomène comporte des risques pour la santé, liés au développement de résistance chez les bactéries et à leur transfert aux bactéries pathogènes pour l'homme et les animaux. Depuis quelques années, on voit apparaître sur le marché des plantes génétiquement modifiées, fruits des techniques du génie génétique. Nombre de ces plantes comportent, inséré dans leur génome, un gène de résistance aux antibiotiques. Ce gène, appelé marqueur, permet de suivre le bon déroulement de l'opération de transgénèse. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent migrer des plantes aux bactéries du tube digestif des animaux ou de l'Homme, ou des plantes aux bactéries du sol (**Youness El Ali, 2008**

## Chapitre 3 : Méthodes de contrôle des résidus d'antibiotique

### 3.1 Résidus des antibiotiques

Les résidus sont définis comme : « toutes substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après administration des médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux et susceptibles de nuire à la santé humaine » (**Laurentie et Sanders, 2002**). La définition de résidus est codifiée dans une directive européenne (**directive 81/851/ CEE, 1981**). Dans cette directive, les résidus sont définis comme étant « tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré ».

### 3.2. Nature et propriétés des résidus

La nature chimique des résidus est fortement conditionnée par les biotransformations et les méthodes de dosage et d'indentification. Deux grands types résidus peuvent être distingués : les résidus extractibles et non-extractibles. Cette distinction est basée sur les possibilités de passage des composés étudiés dans le solvant d'extraction (**Stoltz Rémi, 2008**)

#### 3.2.1. Résidus extractibles

Les résidus extractibles ou « libres » représentent la fraction pouvant être extraite des tissus ou des liquides biologiques par divers solvants, avant et après dénaturation des macromolécules. Les composés concernés sont le principe actif initial et ses métabolites, en solution dans les liquides biologique ou liés par des liaisons non covalentes, donc labiles à des biomolécules. Ces résidus « précoces » qui prédominent dans les premiers jours suivant l'administration du médicament, mais ayant une demi-vie assez brève et dont le taux devient généralement négligeable trois à cinq jours après le traitement. Ils ne forment qu'une proportion faible des résidus totaux (**Dziedzic, 1988**).

### 3.2.2. Résidus non-extractibles

Ils constituent la fraction des résidus qui persistent dans les échantillons de tissus analysés après isolement des résidus libres, leur nature ne peut être déterminée qu'après destruction quasi-complète des protéines, par hydrolyse enzymatique ou acide par exemple. Ce type des résidus non-extractibles forment des complexes macromoléculaires avec des protéines par fixation du principe actif initial ou d'un de ses métabolites sur des protéines. Ces résidus liés ont une demi-vie assez longue et constituent la majeure partie des résidus tardifs (**Dziedzic, 1988**).

### 3.3. Facteurs de risque associés aux pratiques

L'accès à un arsenal thérapeutique proposé par l'industrie pharmaceutique, l'usage croissant de produits antiparasitaires et des antibiotiques pour prévenir et traiter les maladies accroissent la probabilité d'une présence de résidus de ces substances dans les produits d'origine animale.

Les facteurs favorisant la présence des résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale sont, entre autres, le non-respect des délais d'attente après l'administration des antibiotiques, la non-consultation des vétérinaires avant l'utilisation d'antibiotiques, l'absence de formation préalable en production animale et le type d'élevage, intensif ou extensif pratiqué par l'exploitation (**Valérie Get Regine F., 2012**).

Le délai d'attente correspond à la durée consécutive à la dernière administration du traitement pendant laquelle les denrées produites par l'animal ayant reçu le traitement ne peuvent pas être commercialisées. Sa détermination se base sur des études expérimentales menées sur des animaux de destination représentatifs des conditions d'utilisation, mais en bonne santé. La fixation du temps d'attente tient compte de la variabilité pharmacocinétique entre individus dans les différents processus d'absorption, distribution, métabolisation et excrétion des résidus (principe actif et métabolites). Ces processus sont fonction à la fois du statut physiologique de l'animal et des caractéristiques génétiques influençant le métabolisme ou l'excrétion.

Ces études sont pour la plupart menées pour des races représentatives des grandes productions des pays développés et ne tiennent pas compte des particularités des espèces animales africaines qui peuvent différer au niveau de leur patrimoine génétique, mais également en matière de régulation de leur physiologie, adaptée aux conditions climatiques. Ces différences influent sur la cinétique des résidus et pourraient nécessiter d'adapter les temps d'attente requis lorsque les médicaments sont administrés à des races locales. À ce stade de développement des médicaments vétérinaires, ces variations ne sont pas prises en compte (Valerie G., et Regine F., 2012).

**Tableau 3.1 : Principales classes d'antibiotiques et les risques potentiels (Epiez, 2014)**

Classe	Risques pour la santé
<i>Sulfamides</i>	Allergie (avec des éruptions cutanées), le syndrome de Sweet, le syndrome de DRESS, leucopénie
<i>Quinolones</i>	Réactions immédiates d'hypersensibilité (urticair, œdème de Quincke, choc anaphylactique), exanthème, syndrome de Sweet
<i>Bêtalactamines</i>	Réactions immédiates : urticair, œdème de Quincke, rhinite, bronchospasme et choc anaphylactique, une anémie hémolytique, une neutropénie, éosinophilie. Éruptions cutanées, syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell
<i>Tétracyclines</i>	Syndrome d'hypersensibilité du médicament, lupus érythémateux d'origine médicamenteuse comme l'éruption, l'anaphylaxie, le syndrome de DRESS, syndrome de Sweet
<i>Aminoglycosides</i>	Dermatite de contact allergique
<i>Phénicolés</i>	Rare suppression de la moelle osseuse : anémie aplasique
<i>Macrolides</i>	Rares
<i>Lincosamides</i>	Blocage neuromusculaire avec paralysie post-anesthésique, dépression cardiaque après injection IV trop rapide, des allergies et une dégénérescence hépatique modérée

### 3.4. Paramètres fixés pour la protection du consommateur

Selon les propriétés physicochimiques et le mode d'administration de l'antibiotique, il peut rester des résidus d'antibiotique dans les œufs, pouvant être toxiques pour l'homme. Afin d'éviter tout danger pour le consommateur, les prescriptions des antibiotiques sont contrôlées (Ben Azzeddine Chams, 2009).

### 3.4.1. Limite Maximale de Résidus (L.M.R.)

Par définition, c'est « la concentration en résidus à ne pas dépasser dans les denrées alimentaires d'origine animale pour éviter tout risque pour le consommateur du fait de la présence de ces résidus ». Elle s'exprime en ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) par rapport au poids frais (**Ben Azzeddine Chams, 2009**).

### 3.4.2. Dose sans effet

Il s'agit de la dose maximale de substance qui, ingérée quotidiennement durant toute sa vie et chez l'animal le plus sensible, n'entraîne aucun effet négatif dans les conditions actuelles des connaissances. Elle s'exprime en mg de substance par kilo de poids vif et par Jour. Elle est déterminée par un ensemble d'expérimentations réalisées sur des animaux de laboratoire (**Ben Azzeddine Chams, 2009**).

### 3.4.3. Dose journalière admise (DJA)

La Dose Journalière Admissible, que l'on appelle également dose journalière acceptable a été définie en **1973** par le comité **OMS (Organisation Mondial du Santé)** d'experts :« par la dose qui est ingérée quotidiennement par l'homme, même pendant toute une vie, dans son régime alimentaire, ne doit produire aucun effet nocif quel qu'il soit ».

### 3.4.4. Temps d'attente

Selon l'article L 617-2 du **CSP (Code de la Santé Publique)** de la **CEE (Communauté Économique Européenne)**, le temps d'attente d'un médicament défini par :« le délai à observer entre l'administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal, garantissant qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux limites maximales établies par le règlement n°90-2377(CCE) ».



### 3.5. Méthodes de contrôle des résidus

Dans l'UE (union européen), l'autocontrôle et le contrôle des résidus sont basés sur le recours à des méthodes analytiques, mises en œuvre de manière standardisée. Une bonne part de ces analyses se réalise au laboratoire.

Le cadre réglementaire en vigueur au sein de l'UE est basé sur la directive (96/23/CE, (2002) qui structure le réseau des laboratoires officiels en fixant les exigences en termes de qualité et de performances analytiques (décision 2002/657, 12 août 2002). Ce cadre a contribué à l'harmonisation des contrôles. Par contre, dans les pays de l'UEMOA (union économique et monétaire ouest-africaine), le recueil des références des méthodes harmonisées d'analyse des produits alimentaires n'a pas pris en compte les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires.

Les méthodes d'analyse utilisées sont différentes d'un pays à un autre et même d'un laboratoire à un autre, du fait de l'inexistence de méthodes homologuées par l'UEMOA avec la mondialisation des échanges, les méthodes d'analyse doivent être standardisées et appliquées par les différents laboratoires avec des niveaux de performance équivalents. La stratégie de contrôle des résidus est en général basée sur une approche en deux étapes : l'étape de la détection des résidus avec des méthodes sensibles (faible taux de résultats « faux négatifs ») ; et l'étape de confirmation nécessitant une quantification par rapport à la LMR et une identification avec un faible taux de résultats « faux positifs ». (**Maghuin register, 2006**).

#### 3.5.1. Importance et nécessité

La détection des résidus d'antibiotiques est d'une importance majeure sur plusieurs niveaux :

- **Sur le plan médical:** les résidus d'antibiotiques présentent maints risques pour la santé à savoir les allergies, la toxicité, la résistance bactérienne. Leur détection sera d'un grand apport pour l'homme, une clé de sa sécurité sanitaire ;
- **Sur le plan économique:** actuellement une position importante sur le marché mondiale et est liée par des conventions d'export avec d'autres pays. Elle est tenue d'assurer la qualité de ses produits et la sécurité sanitaire de ces clients consommateurs. La présence des résidus d'antibiotiques dans les produits alimentaires sera une fatalité pour sa crédibilité

envers ces pays clients, où la nécessiter de développer et de mettre en place toute la démarche nécessaire pour le dépistage et la détection des résidus d'antibiotiques. La détection des résidus d'antibiotiques se fait par des méthodes de dépistages et des méthodes de confirmations (**Maghuin register, 2006**).

### 3.5.2. Méthodes de détection

Les méthodes les plus utilisées pour la détection des résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale sont les méthodes officielles, qui varient le plus souvent en fonction de la matrice. Pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et le muscle, les méthodes microbiologiques et immunologiques (**maghuin register, 2006**).

**Tableau 3.2 : Quelques bactéries utilisées pour la détection des antibiotiques (Adel Rezgui, 2009)**

Bactéries	Caractéristiques	Antibiotiques deRéférences
<i>Bacillus Stearothermophilus</i>	-Bactérie à Gram (+) en forme de bâtonnet. -Division cellulaire : à 55°C dans un milieu riche	-Sulfamides -βlactamines(Amoxicilline)
<i>Bacillus cureus</i>	-Grand bacille en -Forme bâtonnet à Gram (+). -Division cellulaire : à 30°C dans un milieu riche.	-Tétracyclines(Oxytétracycline)
<i>Escherichia coli</i>	-Bacille Gram (-). -Division cellulaire : toutes les 20minutes à 37°C dans un milieu riche.	-Quinolones(Enrofloxacin)
<i>Micrococcus luteus</i>	- Forme sphériques (des coques) - Division cellulaire : à 37°C dans un milieu riche.	-β lactamines -Macrolides

### 3.5.3. Dépistage des résidus des antibiotiques

Le dépistage des résidus d'antibiotiques se base sur la définition même des antibiotiques. C'est à l'aide de leurs pouvoirs contre la croissance bactérienne qu'ils seront détectés, des bactéries spécifiques à chaque antibiotique sont utilisées pour permettre cette détection. (Tableau3.2).

Parmi les tests de dépistage, on distingue les tests biologiques et les tests physico-chimiques.

### 3.5.3.1. Tests biologiques

Les tests biologiques sont basés sur la croissance ou l'inhibition d'une culture bactérienne. En présence de résidus dans la denrée, les germes sont inhibés tandis qu'en absence de résidus la croissance est effective. Les germes les plus souvent utilisés dans ces tests sont ceux des genres *Bacillus* (*Bacillus subtilis* et *Bacillus Stearothermophilus var calidolactis*) et *Micrococcus* (*Micrococcus luteus*).

Ces bactéries présentent en effet l'avantage d'être sensible à une large gamme de familles d'antibiotiques telles que les Macrolides (Spiramycine, Erythromycine), les Aminosides (Streptomycine), les Pénicillines (Pénicilline G) et les Tétracyclines. Comme inconvénients, ces tests ne permettent pas de connaître ni les teneurs, ni la nature exacte de la molécule présente dans les échantillons analysés. Elles sont de ce fait suivies généralement par des tests de confirmation. On peut citer dans cette catégorie de tests la méthode officielle des quatre (4) boîtes, la méthode des trois boîtes, et leurs variantes améliorées sous forme de kits plus rapides et mieux adaptés aux échantillons de masses (Delvotest®, Copan Test®, Charm FarmTest®, Premi®Test, ValioT101®). (Kantaty Yenbdube, 2011)

#### A. Premi®Test

C'est un test de détection mis au point pour la détection des résidus d'antibiotiques, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs. L'échantillon est laissé à diffuser dans une ampoule contenant du milieu gélosé ensemencé par des spores de *Bacillus Stearothermophilus* avec un indicateur de pH. Après incubation, la croissance normale des micro-organismes provoque l'acidification du milieu ce qui change la couleur de l'indicateur de pH du violet vers le jaune. En présence de substances inhibitrices (résidus d'antibiotiques), si la couleur du milieu reste violette après incubation, l'échantillon est rapporté comme échantillon positif, et si la couleur du milieu vire au jaune l'échantillon est considéré comme échantillon négatif. (Fayçal Elkhaoui, 2009)

### B. Méthode STAR ou méthode des 5 boîtes

C'est une méthode de détection microbiologique des antibiotiques dans le lait, le muscle ainsi le foie gras, les crevettes, les poissons, etc. Elle est basée sur le principe suivant : un microorganisme est ensemencé dans un milieu gélosé, coulé en boîte de Pétri. Après diffusion, la présence des résidus d'antibiotiques produit une zone d'inhibition de l'échantillon en empêchant la croissance bactérienne du microorganisme test. Un échantillon est considéré comme positif quand il donne une zone d'inhibition supérieure à 2 mm (**Adel Rezgui, 2009**).

### C. Delvo®Test

C'est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de détecter les résidus de substances infectieuses dans le lait. La suggestion de positivité de l'échantillon se repose sur la persistance de la couleur du milieu, et on peut dire qu'un échantillon est négatif si le milieu change de couleur c'est-à-dire exerce un effet sur la croissance des microorganismes existant dans le milieu. (**Fayçal Elkhaoui, 2009**)

### D. Tests « rénaux »

Ce test est officiel en Belgique comme test de dépistage des résidus d'antibiotiques dans une carcasse, ce test est basé sur l'inhibition de la croissance des bactéries Bacilles. Ce test est réalisé au moyen de boîtes de Pétri contenant une gélose ensemencée avec la souche *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition dépourvues de colonies bactériennes autour des points de dépôts des échantillons (morceau de rein ou papier filtre imbibé d'exsudat de cortex rénal) sont révélatrices de la présence potentielle d'antibiotiques (**Maghuin rogifter, 2006**).

### E. Tests biochimiques

Ces tests sont très simples à utiliser, ils se présentent sous forme des bandelettes à plonger dans l'échantillon (lait ou extrait liquide) pré-incubées avec des récepteurs marqués à l'orcolloïdal. Après migration du liquide par capillarité le long de la bandelette, la présence d'une seule bande rouge au niveau supérieur (contrôle de validité du test qui doit être présent dans tous les cas) indique la présence d'antibiotique. Alors qu'en absence de ces substances deux bandes colorées sont visibles (**Adel Rezgui, 2009**).

## F. Test des 4 boîtes

Lors de la 1ère certification NF VALIDATION obtenue en juin 2006, la méthode des 4 boîtes était la méthode de référence officielle en France. Cette dernière a pour Object, à l'aide de microorganismes sensible, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies de palmipèdes. (**Michel Laurentie et al., 2002**).

### 3.5.3.2. Tests physico-chimiques

Ce sont des tests essentiellement de nature enzymatique, immuno-enzymatique, immunologique et parfois chromatographique. Les méthodes enzymatiques ont pour principe l'inhibition d'une enzyme en présence d'un résidu d'antibiotique spécifique. En absence de résidus, l'enzyme est révélée par un indicateur coloré, tandis qu'en présence des résidus l'enzyme est inhibée et n'est plus alors révélée par l'indicateur coloré. Les tests immuno-enzymatiques et immunologiques sont quant à eux basés sur des réactions de type antigènes-anticorps.

La technique la plus répandue est le test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay) avec comme principes de détection le marquage des enzymes par des chromophores ou même la radioactivité. Les méthodes ELISA sont également disponibles sous forme de kits utilisables pour les échantillons de masse et dont certains sont spécifiques à des résidus d'antibiotiques donnés ou pour un groupe de composés apparentés comme par exemple le groupe des fluoroquinolones. On peut citer dans cette catégorie de tests le Delvo X Press TM BL®, le  $\beta$ etastar®, le MRL Test®, le Snap Bêtalactamines®, le Snap Tétracycline®.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC en anglais) vient compléter la liste des tests physico-chimiques. Il est utilisé dans la détection de multiples résidus d'antibiotiques tels que les résidus de quinolone, de sulfamide, de  $\beta$ -lactamine, de macrolide, de tétracycline, et ce, dans des types d'échantillons très variés tels que le lait ou les tissus. Mais il est le plus souvent utilisé pour quantifier les résidus détectés. (**Kantaty Yenbdube , 2011**).

### 3.5.4. Méthodes de confirmation

Les échantillons détectés positifs sont analysés au moyen de méthodes de confirmation recourant à différentes techniques d'analyse physicochimique comme la chromatographie liquide associée à une détection UV, par fluorimétrie ou couplée à des spectromètres de masse. Les méthodes sont conçues pour atteindre un certain nombre de critères de performance qui sont vérifiés lors des études de validation requises avant leur utilisation pour le contrôle réglementaire, en vertu des décisions **2002/657/EC**. Plusieurs méthodes physicochimiques de confirmation ont été développées :

- HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) ;
- CCM (Chromatographie sur Couche Mince) ;
- ELL (Extraction Liquide-Liquide).

La chromatographie est une bonne méthode de séparer les substances l'une de l'autre ainsi que les impuretés présentes dans les matrices. A l'aide de ces tests, il est possible d'analyser un grand nombre de substances et d'échantillons en 24-48h. Une méthode de confirmation devrait établir de manière non équivoque l'identité du résidu. Au cours du contrôle officiel des résidus de médicaments, un dosage quantitatif fiable doit être utilisé à un stade approprié. L'estimation quantitative doit permettre d'établir si la concentration en résidus excède ou non la limite maximale du résidu fixé (**Adel Rezgui, 2009**).

### 3.6. Effet de la température sur les résidus des antibiotiques

L'utilisation intensive d'antibiotiques en tant que thérapie, prophylaxie et promoteur de croissance chez les animaux producteurs d'aliments soulève l'inquiétude concernant l'apparition des résidus d'antibiotiques dans les tissus comestibles après l'abattage (**Anadon et Martinez Larranaga, 1999**). Les résidus d'antibiotiques dans les aliments ont été liés à des problèmes croissants de santé publique concernant la propagation des microorganismes résistants aux antibiotiques au cours des 50 dernières années, de nombreux chercheurs ont été intéressés à évaluer si les résidus d'antibiotiques peuvent être détruits par des procédures de cuisson, la pasteurisation ou les processus de mise en conserve (**Isidoriet al.,2005 ; Hassani et al., 2008**).

Traditionnellement, la stabilité thermique des antibiotiques a été étudiée en fonction de l'évaluation de diminution de l'activité antimicrobienne ou de l'analyse chromatographique spécifique du changement de concentration après les traitements thermiques. En effet, des études ont été effectuées à l'aide d'analyses microbiologiques et chimiques pour évaluer la stabilité thermique des résidus des médicaments vétérinaires (Franje *et al.*, 2011). De plus, si le chauffage de ces composés et les éventuels changements structuraux générés entraînent une modification de la génotoxicité qui pourrait contribuer à la mutagénicité des bactéries.

Des études antérieures ont suggéré que l'oxacilline (OXA), le chloramphénicol, les aminoglycosides, les quinolones, la clindamycine, la novobiocine, le triméthoprim, la vancomycine et l'azlocilline de sulfaméthazine (SMZ) (Papapanagiotou *et al.*, 2005), sont stables à la chaleur (Traub et Leonhard, 1995), tandis que l'Oxytétracycline (OTC) (Hassani *et al.*, 2008) et l'érythromycine se révèlent être labile à la chaleur. D'autre part, plusieurs  $\beta$ -lactames tels que la pénicilline (PCN) G, l'ampicilline (AMP) et l'amoxicilline (AMX) apparaissent partiellement inflammables (Traub et Leonhard, 1995).

Les antibiotiques de la même classe ont également reçu des stabilités de chaleur différentes en fonction de différents types de matrices et de traitement thermique impliqués (Kitts *et al.*, 1992 ; Rose *et al.*, 1996 ; Franje *et al.*, 2010).

D'autre part, la plupart des études de stabilité à la chaleur ont évalué la dégradation des médicaments parentérales avec peu d'études réalisées sur la production possible de produits de dégradation toxique (Gratacos Cubarsi *et al.*, 2007 ; Franje *et al.*, 2010).

### 3.6.1. Stabilité des résidus de tétracycline pendant la cuisson

Généralement, les résidus de tétracycline (TC) sont relativement instables. La température pendant la cuisson a le plus grand impact sur la perte du résidu de tétracycline (Abou-Rayaet *et al.*, 2013). Ils ont montré que les résidus d'Oxytétracycline dans le foie des bovins et les muscles des moutons ont été réduits pendant la cuisson.

Les changements des procédés de cuisson sur l'Oxytétracycline (OTC), la tétracycline (TC) Chlorotétracycline (CTC) et Doxycycline (DOC) en poitrine de poulet et cuisse, et déterminé le temps de cuisson pour rendre l'échantillon cuit plus sûr pour la consommation.

La procédure de cuisson était l'une des plus importants agents qui ont influencé les résidus de TC. Parmi les différentes procédures étudiées, la micro-onde était le plus efficace. Il est évident que plus le temps de cuisson est élevé, plus la perte des résidus est grande. Pendant le traitement thermique, on a identifié que le TC c'est le plus stable et le plus instable sont la doxycycline et l'Oxytétracycline, Si la température et le temps de cuisson sont suffisants, nous pourrait assurer des pertes importantes de résidus de TC ; donc la cuisine offre une marge de sécurité pour les produits contenant des TC (**Ibrahim, 1994 ; Hassani et al., 2008**).

Selon Les études de la stabilité thermique de l'Oxytétracycline, la tétracycline, et la doxycycline à une température ultra haute, c'était à identifier que leur destruction suit une réaction de premier ordre de cinétique. En ce qui concerne la stérilisation, traitements de longue durée (stérilisation conventionnelle) Détruirait > 98% de la concentration initiale de résidus des trois antibiotiques, haute température à court terme les traitements (HTST) laisseraient des résidus inchangés dans la gamme de 50 à 90% (**Hassani et al., 2008**).



# **Partie expérimentale**

## Chapitre 4 : Matériel & Méthodes

### 4.1 Rappel sur les objectifs

Cette étude est s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'OTC et la stabilité de la structure chimique (moléculaire) suite à l'exposition a des traitements thermiques.

La démarche a débuté par le choix dessouches bactériennes qu'ont présenté une résistance ou une sensibilité connue selon la littérature vis-à-vis l'antibiotique ciblé (OTC). Ensuite ce dernier est exposé à différents traitements thermiques (80, 100, 120, 140 et 160 °C). La stabilité de la structure chimique est vérifiée à l'aide d

'un spectrophotomètre d'absorption, tandis que, la modification de l'activité antibactérienne est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition.

### 4.2 Choix de l'antibiotique

Nous choisissons un antibiotique naturel de la famille des tétracyclines (OTC) grâce a sont large spectre sur les bactéries à Gram positives et négatives et aérobie et anaérobie et pour son utilisation dans les deux domaines humaine et vétérinaire.

### 4.3 Choix des températures de traitement

L'OTC et une antibiotique thermostable, le choix des températures pour évaluer son activité antibactérienne et son stabilité moléculaire est prend en considération les différentes températures qui peuvent être utilisées pour la cuisson ou les traitements thermiques des aliments.

### 4.4 Matériel biologique

#### 4.4.1 Les souches bactériennes

Pour évaluer la modification de l'activité antimicrobienne de l'OTC avant et après le traitement thermique en utilisant des souches de référence American type culture collection (ATCC) (Tableau4.1) Parmi toutes les souches bactéries sensibles qui existe, nous avons choisi quatre souches bactériennes sensibles et une bactérie résistante.

**Tableau 4.1** : Codes des souches bactériennes de référence utilisées

Souche bactérienne	ATCC	Caractéristiques de la souche
<i>Escherichia Coli</i>	25922	Sensible
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	
<i>Staphylocoques aureus</i>	1249	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	
<i>Streptocoque</i>	49619	Résistance

#### 4.4.2 Caractéristique des souches bactériennes étudiées

##### 4.4.2.1.Préparation de pré-culture

À partir des tubes inclinés des souches bactériennes, nous avons préparé des cultures jeunes dans le bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 18 à 24h, ensuite, les boîtes de Pétri coulées avec la gélose nutritive sontensemencées avec l'inoculum des cultures jeunes et incubées à 37° C pendant 18 à 24h.

##### 4.4.2.2.Coloration de Gram

La morphologie, l'arrangement des cellules et le type pariétal des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique. Le mode opératoire a consisté à :

- Réaliser un frottis et le fixer avec la proximité d'un bec bunsen ;
- Colorer avec violet de gentiane durant une minute ;
- Rincer avec l'eau du distillé ;
- Recouvrir la lame par le Lugol une minute (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration) ;
- Rincer avec l'eau distillée ;
- Plonger 3 ou 4 fois à une demi-seconde dans un pot d'alcool puis rincer à l'eau distillée immédiatement. Les bactéries Gram négative sont alcool-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram positive ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcool résistantes et restent colorées violet ;
- Rincer une contre coloration à l'aide de la fuchsine ou de safranine pendant une minute. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuchsine.
- Les Gram positives apparaissent donc violettes, les Grams négatifs recolorés par la fuchsine, apparaissent roses.
- Rincer à l'eau distillée et sécher entre deux feuilles de papier absorbant observé à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.

#### 4.4.2.3. Antibiogramme

L'antibiogramme a pour but de déterminer la résistance et/ou la sensibilité des souches sélectionnées et mesurer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il existe trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : sensible (S) résistant (R) et intermédiaire (I) (CASFM, 2016). Le protocole consisté à :

- Liquéfier le milieu de Muller-Hinton dans un bain marie à 95°C ;
- Couler dans 5 boîtes de Pétri et laisser de refroidir à 45°C ;
- Ensemencer séparément les souches bactériennes par la technique d'étalement l'aide d'une micropipette : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylocoques aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *streptocoque* ;
- Déposer les disques d'antibiotique (tétracycline) dans chaque boîte ;
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.

#### 4.4.3 Analyse proprement dite

##### 4.4.3.1. Traitement thermique

Déposer 06ml d'OTC (**Oxtra®20%, Fatro**) dans une série des tubes stériles à l'aide d'une pipette graduée emballée par un papier d'aluminium et ensuite incubé séparément chaque tube dans une température convenable (80°C, 100°C, 120°C, 140°C, 160°C) pendant 20 minutes.

##### 4.4.3.2. Contrôle de l'effet de DMSO

Le DMSO (Diméthylsulfoxyde) est utilisé pour la dilution de l'OTC dans cette étude, mais une analyse préliminaire pour évaluer l'existence ou non d'une activité antibactérienne de ce dernier, par la méthode de la diffusion sur un milieu gélosé.

Dans une zone stérile à l'aide d'un bec bunsen, cinq boîtes de Pétri ont été coulées par milieu de culture (Muller-Hinton) et ensuite ensemencer séparément par l'étalement en surface des souches bactériennes (**Tableau 4.1**). Des disques en papier ont été imbibés par DMSO. Chaque disque est disposé on milieu de chaque boîte puis incubé 37°C pendant 24h

##### 4.4.3.3. Calculée la concentration

Pour préparer des disques de l'OTC avec des concentrations similaires avec la concentration des disques d'antibiotique commercialisé (OTC). La recherche est faite par la méthode suivante :

20 g       $\longrightarrow$       100ml

**0.3µg** —————→ **X**

**20g** : la quantité de l'OTC dans 100ml de produit qui en a utilisée.

**100ml** : la quantité de flacon qui contiens le l'OTC.

**0.3µg** : la quantité d'antibiotique dans une (01) disque commercialisée.

**X** : c'est la quantité de produit recherchée par (ml) pour imbibée les disques.

Après les calculs **X = 1,5. 10<sup>-5</sup>**

Pour préparer des disques stériles avec une quantité égale 0.00015 en commence par une concentration de 1.5mL et en diluée par la méthode de dilution décimale.

#### 4.4.3.4. Dilution de l'OTC par DMSO

Par la technique de la dilution décimale on réduire la concentration des tubes qui d'OTC de chaque température séparément avec la même méthode dans une zone stérile; en remplissant 03 tubes par 8.5ml de DMSO dans chacun et en introduisant dans chaque tube 1.5ml d'OTC pour réaliser la suspension mère ensuite nous homogénéisons le tube par le vortex et nous avons prendre 1.5ml de solution mère et en introduisant dans la deuxième tube c'est la concentration  $10^{-1}$  Et après homogénéisation de tube par le vortex nous prenons 1.5ml de deuxième tube et en le mettre dans la troisième tube c'est le tube de  $10^{-2}$ .



**Figure 4.1** : La dilution de l'OTC

#### 4.4.3.5. Calcul de la charge bactérienne

Dans une zone stérile, cinq ml de l'eau physiologie est déposé séparément dans cinq tubes, ensuite à l'aide de lance de platine on introduit dans chaque tube une souche bactérienne après on les homogénéisé parle vortex.

Pour connaître la charge bactérienne dans chaque tube nous avons utilisé l'eau physiologie comme témoins. La mesure a été réalisée à la longueur d'onde de 530nm (**Tableau 4.2**). Le calcul de la charge par la méthode comme suit :

$$\begin{array}{ccc} 2000\mu\text{L} & \longrightarrow & \text{Y} \\ 20\mu\text{L} & \longrightarrow & \text{X} \end{array}$$

**Y** : charge bactérienne initiale ;

**2000  $\mu\text{L}$**  : Volume de l'eau physiologie dosée pour chaque souche ;

**20 $\mu\text{L}$**  : Volume utilisée pour l'ensemencement ;

**X** : la charge bactérienne ensemencée dans la boîte de Pétri.

**Tableau 4.2** : les charges bactériennes

Souche bactérienne	Y	X
<i>Escherichia coli</i>	0.760	7.6
<i>Bacillus subtilis</i>	0.215	2.15
<i>Staphylocoques aureus</i>	0.400	4.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.700	7.0
<i>Streptocoque</i>	0.222	2.22

## 4.5 Antibiogramme

Nous avons utilisé la méthode des disques pour évaluer l'activité inhibitrice de la molécule d'OTC après traitement thermique, et comme témoin, l'OTC sans traitement thermique par la même méthode.

### 4.5.1 Préparation des boîtes de Pétri

Dans une zone stérile, nous avons préparé une série de 60 boîtes de Pétri coulés par milieu de culture (Muller-Hinton). Pour chaque traitement thermique nous avons utilisé 10 boîtes de Pétri. Ensuite en réalisant l'ensemencement par un inoculum de 20 $\mu\text{L}$  (UFC/ml) à la surface de gélose.

#### 4.5.2 Application des disques

Des disques ont été préparé à base de l'OTC non exposé a aucun traitement thermique (Témoin) et après l'exposition de ce dernier a une série de température (80°C, 100°C, 120°C, 140°C et 160°C) pendant 20 minutes. Pour chaque traitement thermique donné, nous avons testé l'activité antibactérienne sur les bactéries citées précédemment dans le tableau 4.1 après une incubation à une température de 37°C pendent 24h.

La lecture des résultats se faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, un diamètre égal ou supérieur à 20 mm est considéré comme un résultat positif.

#### 4.6 Mesure de la concentration d'OTC par spectrophotométrie

Pour l'évaluation de l'effet de température sur la molécule d'OTC nous avons fait la comparaison entre les doses des concentrations avant et après le traitement thermique par la méthode de spectrophotométrie à une longueur d'onde égale 530nm.

En premier lieu, nous avons mesuré la densité optique de l'OTC avant traitement et ensuite les différentes préparations de l'OTC ont été mesurées aussi mais après l'exposition aux températures fixées dans la présente étude. Les résultats obtenus pour ces dernières ont fait l'objet de la comparaison avec seuls de l'OTC avant traitement.

**Analyse statistique : IBM, SPSS 20, CHICAGO.**



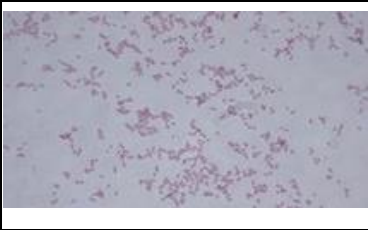
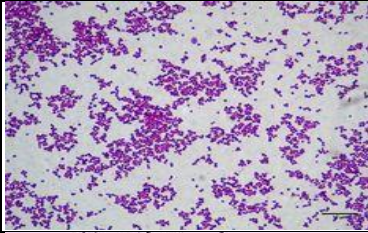

## Chapitre 05 : Résultats et discussions

### 5.1 Tests de confirmation

#### 5.1.1 Coloration de Gram

Le (Tableau 5.1) montre les résultats obtenus suite à l'observation microscopique des souches bactériennes utilisées dans la présente étude.

**Tableau 5.1** : Résultat de l'observation microscopique de la coloration de Gram

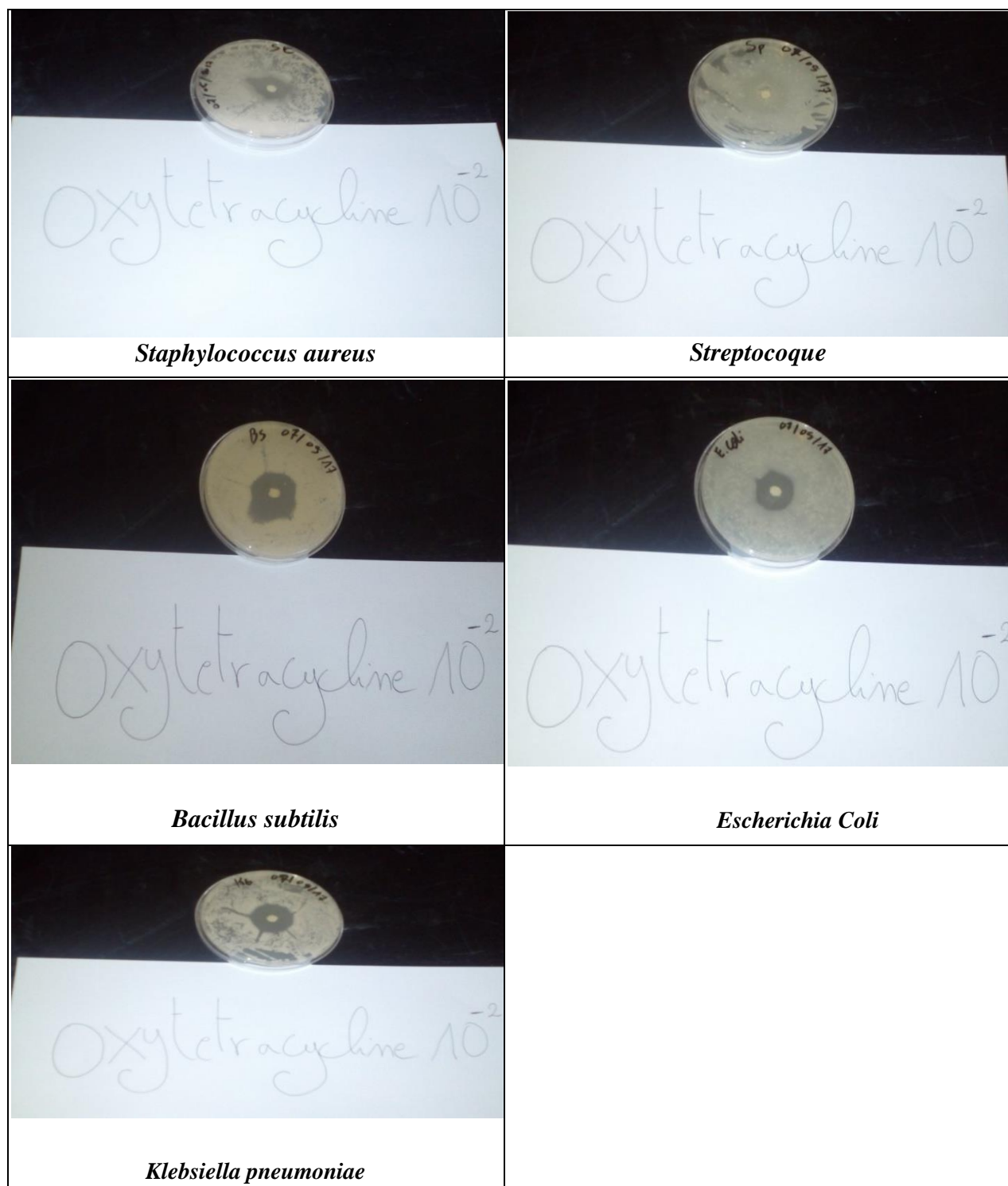
Souches Bactériennes		Observation Microscopique
<i>Bacillus subtilis</i>		A montré les formes des bacilles avec les extrémités et une coloration violette, ces cellules sont disposées en amas et en chainettes caractérisant les <i>Bacillus subtilis</i> à Gram positif
<i>Escherichia Coli</i>		A montré les formes des bacilles avec les extrémités et une coloration rose, mobiles, non sporulée, caractérisant <i>E. Coli</i> à Gram négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		A montré les formes des bacilles disposées comme un amas de bougrement avec les extrémités de couleur rose, non sporulée, caractérisant <i>Klebsiella pneumoniae</i> à Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>		A montré les formes des cocci (ronde) disposées en amas avec les extrémités et une coloration violet, caractérisant <i>Staphylococcus aureus</i> à Gram positif
<i>Streptocoque</i>		A montré les formes des cocci (ronde) disposées en chaînant avec les extrémités de couleur violet, caractérisant <i>Streptocoque</i> à Gram positif

.



### 5.1.2. Antibiogramme sans traitement thermique

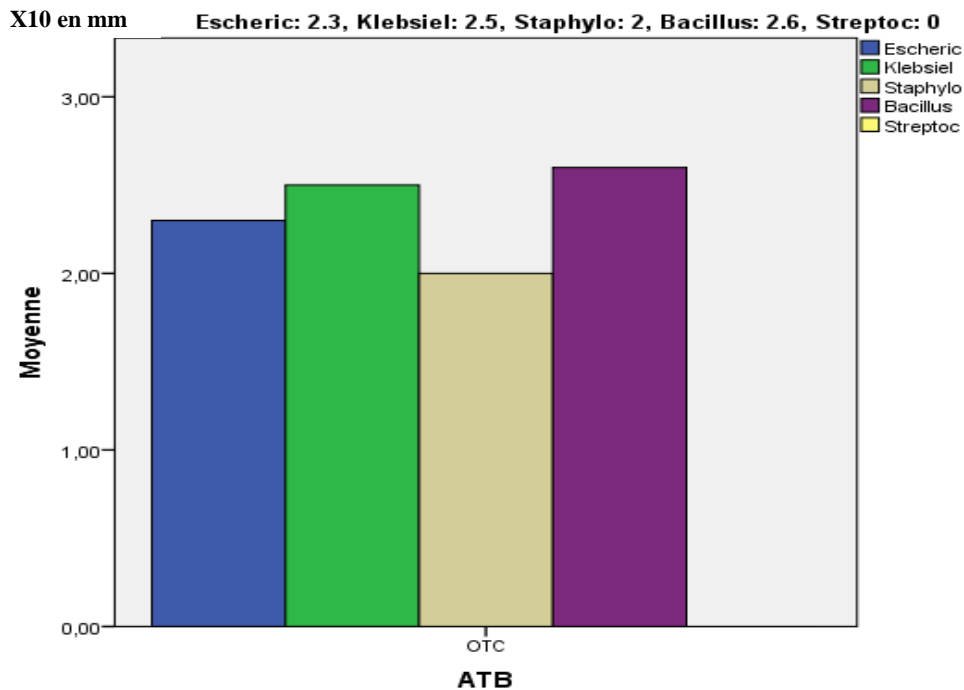
Les résultats de la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes de référence testées à l'antibiotique (Oxytétracycline) montrées dans la (**Figure 5.1**).



**Figure 5.1** : Les souches bactériennes testées par l'OTC avant traitement

Ce test nous permettant de connaître la capacité de réponse des bactéries à l'OTC, cette réponse est variée d'une bactérie à une autre, en effet, le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Casfm,2016 et Afssaps ,2005) a classé les bactéries selon leur sensibilité ou résistance aux antibiotiques en souche sensible(S), intermédiaire(I) et résistante(R)par rapport à la zone de l'inhibition.

Dans l'histogramme suivant (Figure 5.2) nous avons utilisé des résultats de l'antibiogramme avant le traitement thermique de l'OTC nous prenons ce résultat comme témoin pour les prochains résultats après la réalisation de traitement thermique de OTC.



**Figure 5.2** : Histogramme des résultats de l'antibiogramme par (OTC) avant traitement.

La sensibilité bactérienne à l'OTC variée d'une souche à une autre, nous avons marqué une moyenne de sensibilité variée entre (23 et 26) mm, d'après cet histogramme, *Bacillus subtilis* est la bactérie le plus sensible suivie par *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* et *Staphylococcus aureus*. Alors que les *Streptocoque* est totalement insensible (résistante).

La sensibilité des souches bactériennes à l'OTC à un antibiotique peut être innée (Andréanne luipen, 2015) comme le cas de, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* et *Staphylococcus aureus*. La résistance naturelle ou "intrinsèque" correspond à la résistance de plusieurs souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien à un antibiotique (Cheikh Saad-Bouh, 1998).

## 5.2 Antibiogramme (OTC) après traitement thermique

Dans notre étude, nous voulions vérifier l'effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'OTC sur des souches bactériennes de référence qui ont présenté une sensibilité variée à cet antibiotique. Les principaux résultats obtenus, ont montré une différence de la sensibilité nettement marquée que ce soit avant (Figure 5.2), ou après le traitement thermique. L'appréciation des changements l'activité antimicrobienne d'un antibiotique est basée sur des tests tels que le test de concentration inhibitrice minimale (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition (Lei et al., 2016). L'étude de Hsieh et al. (2011) a démontré que dans l'eau, l'OTC se dégrade plus à 100 °C qu'à 121°C.

### 5.2.1 Effets des traitements thermiques de l'OTC sur les bactéries testées

Nous avons utilisé la méthode des disques avec les souches (*Bacillus subtilis*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylocoques aureus*, *Streptocoque*) à la concentration de  $10^6$  UFC/ml pour évaluer l'activité inhibitrice de la molécule d'oxytétracycline après traitement thermique.

#### 5.2.1.1 *Bacillus subtilis*

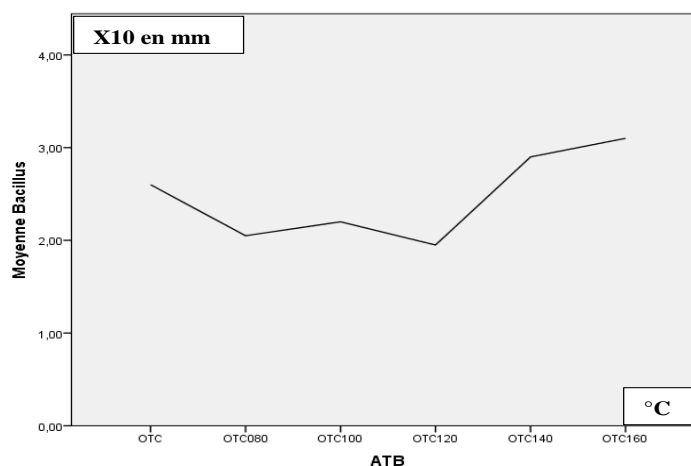


Figure 5.3 : Courbe des résultats des zones d'inhibitions (*Bacillus subtilis*)

D'après la (**figure 5.3**) les résultats obtenus ont montré une activité antibactérienne de l'OTC avant traitement thermique et après le traitement par (80, 100, 120°C) marqué par des moyennes de diamètre d'inhibition presque similaire (de 20 à 25 mm) sur *Bacillus subtilis*. Tandis que, cette activité a augmenté considérablement après l'exposition de L'OTC a des températures élevées supérieure à 120° C (diamètre des zones d'inhibition est supérieur à 30 mm).

La paroi bactérienne est principalement formée d'un polymère de peptidoglycane. Les monomères de peptidoglycane sont assemblés de façon ordonnée afin de former plusieurs couches rigides qui entourent la bactérie et lui confèrent une résistance essentielle pour contrer la forte pression osmotique intra-cellulaire. Cette pression varie énormément suivant le type de bactéries (**Bernard Rémi, 2007**). Chez *B. subtilis* l'absence de paroi provoque ainsi une lyse rapide de la cellule. La mobilité bactérienne nécessite également la présence de cette paroi. En effet, les structures flagellaires permettant cette mobilité ont besoin d'exercer une force sur une surface solide (la paroi) afin de permettre le mouvement. Enfin, la paroi joue un rôle prépondérant lors de la division cellulaire ou encore de la sporulation, essentiellement chez les bactéries à Gram positif. Chez ces dernières, la formation du septum de division, et donc la séparation finale des deux cellules filles, se fait par synthèse de peptidoglycane. D'autre part, l'étape de confinement de la spore naissante (« en gulfment ») est également dépendante d'une synthèse accrue de peptidoglycane. Outre le peptidoglycane, on peut trouver dans la paroi d'autres molécules et leur nature diffère énormément entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, on trouve essentiellement une molécule lipoprotéique nommée lipoprotéine de Braun. Cette protéine a un rôle structural car elle relie la mince couche de peptidoglycane à la membrane externe maintenant ainsi un espace constant entre ces deux structures (**Bernard Rémi, 2007**)

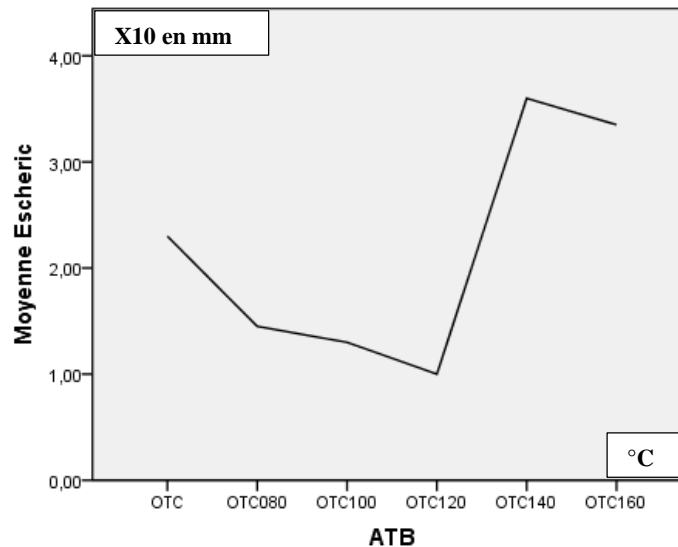
Le mécanisme de synthèse du peptidoglycane est conservé dans l'ensemble des bactéries et est un processus biochimique spécifique non retrouvé chez les autres organismes.

De plus, ce processus est crucial pour l'ensemble des bactéries. Ces caractéristiques en font une cible majeure pour les antibiotiques (**Koch, 2003**).

L'oxytétracycline possède un spectre d'activité large, étendu des bactéries à Gram positif à celles à Gram négatif. L'oxytétracycline est un antibiotique bactériostatique inhibant la protéosynthèse bactérienne dont le spectre d'activité s'étend des germes

Gram positif aux germes Gram négatif. Elle est également active sur les bactéries anaérobies, les mycoplasmes, les rickettsies, les Chlamydiae et les leptospires. Elle possède enfin une activité sur les amibes. (Sako Agaïchatou Assagaye DICKO, 2010)

### 5.2.1.2 *Escherichia Coli*



**Figure 5.4:** Courbe des résultats des zones d'inhibitions d'*Escherichia Coli*

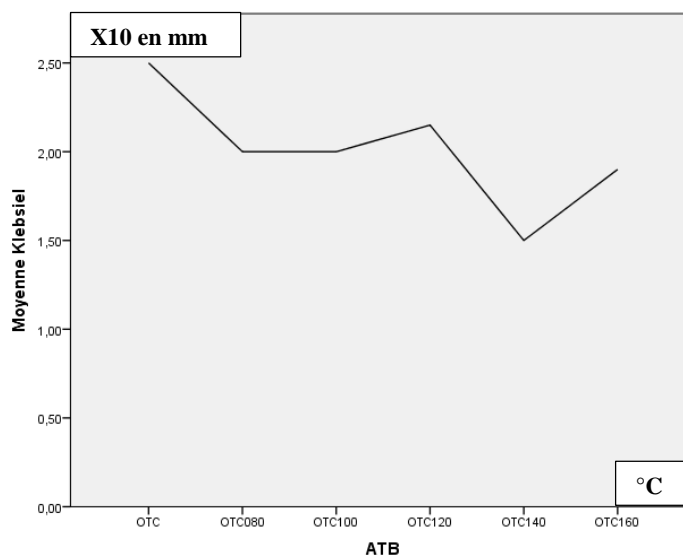
*Escherichia coli* c'est une bactérie normalement sensible à l'OTC (diamètre supérieur à 20mm) (Figure 5.4). Cependant, elle devient moyenne sensible à l'OTC après les traitements thermiques à 80, 100 et 120°C de diamètre entre [10 et 15] mm. Les tests de l'activité antibactérienne de l'OTC après l'exposition de ce dernier à (140 et 160°C) ont révélé des moyennes de diamètres des zones d'inhibition évoluent de manière inversement proportionnelle aux premiers tests manifestée par des moyennes de diamètre de zones d'inhibition supérieures à 30mm.

Les OTCs empêchent la fixation des aminoacyl-ARN sur le site des ribosomes. Ils inhibent la synthèse des protéines par fixation à la fraction 30S des ribosomes bactériens et cette action est bactériostatique. En outre elles altèrent la membrane cytoplasmique ; ce qui inhiberait la réplication de l'ADN par perte de nucléotides (Makan Dioura, 2007).

### 5.2.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

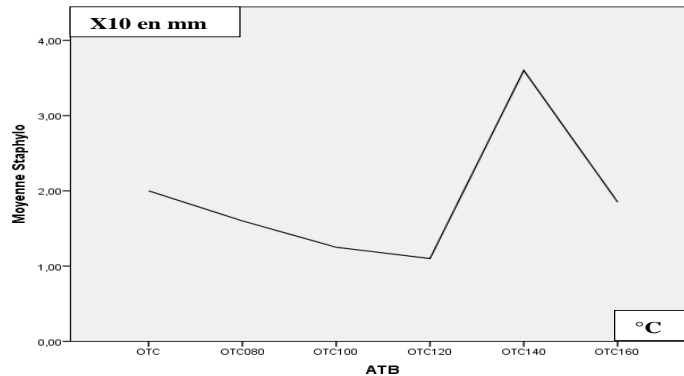
À l'inverse de *Bacillus subtilis* et *E.coli*, le test de l'activité antibactérienne de l'OTC140°C et OTC160°C sur *Klebsiella pneumoniae* se traduit par une résistance (diamètre inférieur à 20mm). L'antibiotique remonte à la toxine dans OTC [140,160°C].

La résistance de la bactérie à OTC140 °C est expliquée par leur capacité de résistance contre la toxine qu'en à obtenir lorsqu'elle est naturellement sensible à la famille de tétracycline environ 78% (Zineb Belbel, 2014)



**Figure 5.5:** Courbe des résultats des zones d'inhibitions *Klebsiella pneumoniae*

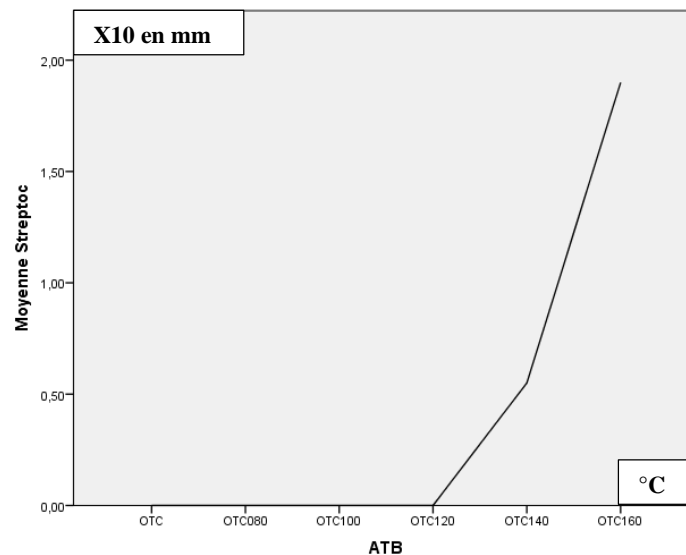
#### 5.2.1.4 *Staphylococcus aureus*



**Figure 5. 6 :** Courbe des résultats des zones d'inhibitions *Staphylococcus aureus*

La (Figure 5.6) a présenté un effet antibactérien décroissant de l'OTC 80°C, OTC 100°C et OTC 120°C sur les *Staphylococcus aureus* qui a présenté une résistance. Tandis que, l'équation a changé avec l'OTC 140°C et 160°C. le taux de résistance élevés ont été notés avec certains antibiotiques tels que l'OTC (100 %) (Nafissatou Dia, 1998)

#### 5.2.1.5 *Streptocoque*



**Figure 5.7:** Courbe des résultats des zones d'inhibitions *Streptocoque*

Les *Streptocoques* sont des bactéries naturellement résistantes au l'OTC, les traitements thermiques à 80, 100 et 120°C ne sont rien changés dans cette résistance. Néanmoins, à partir de 120°C, l'inhibition de cette bactérie est légèrement affectée et les *Streptocoques* deviennent moyennement sensibles.

Selon (Casfm, 2016) ce germe bactérien est très résistant au OTC ce que confirme la première partie du résultat obtenu en (figure 5.7). Le changement de la sensibilité de *Streptocoque* de bactérie résistante de cet ATB à sensible de ce dernier ça qui confirme l'hypothèse de changement de molécule d'OTC et l'apparition d'une nouvelle molécule toxique ou bioactive selon le changement de la résistance de bactérie résistante au L'OTC à une bactérie sensible.

### 5.3 Effets des traitements thermiques sur l'OTC

L'analyse statistique par l'utilisation de la corrélation de Pearson entre les traitements thermiques de l'OTC et l'activité inhibitrice sur les bactéries testées ont montré une corrélation significative entre l'OTC avant traitement et l'OTC après les traitements aux 80, 100 et 120°C. Néanmoins, aucune corrélation a été observée entre l'activité antibactérienne marquée après les traitements thermiques de l'OTC aux 140 et 160°C et l'OTC avant traitement thermique (Tableau 5.2).

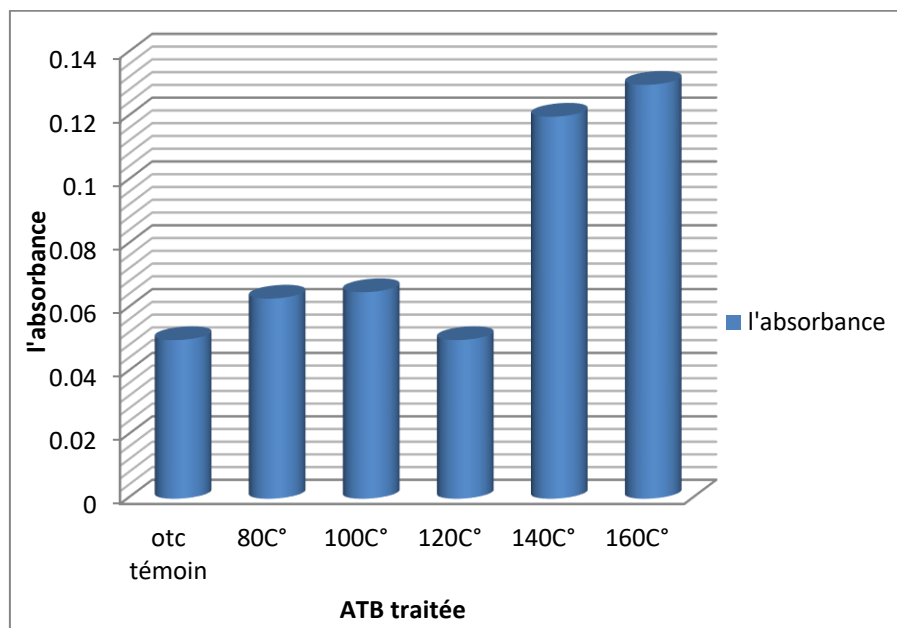
**Tableau 5.2 :** Corrélation de Pearson entre les traitements thermiques de l'OTC et l'activité inhibitrice sur les bactéries testées.

	OTC	OTC080	OTC100	OTC120	OTC140	OTC160
OTC	1	0,980**	0,948*	0,891*	0,673	0,460
OTC080	0,980**	1	0,976**	0,944*	0,590	0,320
OTC100	0,948*	0,976**	1	0,977**	0,461	0,373
OTC120	0,891*	0,944*	0,977**	1	0,295	0,201
OTC140	0,673	0,590	0,461	0,295	1	0,548
OTC160	0,460	0,320	0,373	0,201	0,548	1

\*\* La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

\* La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).





**Figure 5.8 :** Histogramme des résultats d'absorbance de l'OTC après le traitement

La (**Figure 5.8**) a montré les résultats des densités optiques obtenues pour chaque OTC traité. Nous avons comparé les résultats obtenus avec l'OTC témoin (OTC sans traitement thermique) Il apparaît que l'absorbance a augmenté légèrement et la concentration d'antibiotique diminue après exposition à 100°C par rapport à celle obtenue par OTC témoin. Néanmoins, nous avons observé une absorbance importante après l'exposition aux 140°C et 160°C. Ces changements pouvant être expliqués probablement par une modification de la structure de la molécule sous l'effet de la chaleur (**Jean Lederer, 1986**). Ces résultats nous permettant de déduire que l'effet des traitements thermiques la molécule de l'OTC engendre l'apparition des nouveaux produits toxiques ou bioactives avec un effet antibactérien plus marqué que l'OTC lui-même, cela est expliqué aussi par la sensibilité marquée de germes normalement insensibles et confirmé par l'étude de **Kuhne et al. (2001)** qui ont trouvé que l'effet d'un antibiotique peut s'accroître après un traitement thermique, et c'est dû à l'apparition des produits de dégradation qui sont plus toxiques que la molécule mère.

L'étude de la cinétique et de l'activité inhibitrice de la molécule d'OTC a montré une diminution croissante de cette activité inhibitrice sous l'effet thermique jusqu'à une certaine température (120°C) et paradoxalement cet effet inhibiteur reprend au-delà de cette température. Cependant il faut noter que la destruction de la molécule d'antibiotique dépend de plusieurs facteurs, à savoir : la température, la durée de chauffage, la nature d'antibiotiques (**Jean Lederer, 1986**). Ceci dit il semble bien que la cuisson n'ait pas d'effet direct sur la molécule d'ATB cependant il y a lieu de

penser que la molécule peut subir des modifications sous l'effet de la cuisson mais son spectre d'action sur les souches demeure le même. L'étude de l'effet de la chaleur sur les résidus d'OTC dans le muscle de poulet de chair à été étudié par plusieurs auteurs (**Ibrahim et Moats (1994)**, **Abou-Raya et al. (2013)**), mais leurs conclusions sont souvent éparses et même contradictoires.

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis d'être initiés à l'étude des antibiotiques in vitro, ce qui constitue une base scientifique nous permettant d'initier des travaux sur l'activité antibactérienne de l'oxytétracycline, sur certaines bactéries à Gram positive et à Gram négative. Par ailleurs, l'étude de la stabilité thermique d'oxytétracycline dans différentes conditions de traitement et l'effet de la température sur la molécule OTC.

En particulier, le travail réalisé a montré la cinétique de dégradation des antibiotiques ont été complétées pour évaluer les relations entre la dégradation des antibiotiques et le temps et la température de traitement et la variation de l'activité antibactérienne de l'OTC sur certaines bactéries à Gram positive et à Gram négative.

Pour ces tests biologiques, la dégradation a été mesurée par la modification de l'activité antimicrobienne telle que la concentration minimale inhibitrice (MIC) et le diamètre de la zone d'inhibition avant et après le traitement.

L'OTC se dégrade à des températures plus à 100 ° C. la cinétique thermique de OTC était pseudo-premier ordre sous 100 ° C, et de premier ordre à des températures plus élevées (110-140°C) Cela peut expliquer la sensibilité des souches qui utilise a été changé au de la température de 120°C grâce à la modification de l'activité antibactérienne de l'OTC à cause de la haute température, la stabilité thermique de dépend de la température et une dégradation plus élevée a été détectée à une température plus élevée (121 ° C).

L'activité anti - microbienne de l'OTC est considérée comme dépendante de certaines exigences structurelles et la réduction de l'activité biologique est ainsi attribuée à des changements structurels à d'importantes positions de carbone. Jusqu'à présent, les informations concernant la toxicité de la dégradation de l'OTC sont limitées.

D'après les études disponibles, on peut conclure que, en général, le traitement thermique conduit à la dégradation des antibiotiques et par conséquent une réduction de la concentration moléculaire ou de la bioactivité de l'antibiotique traité cette modification représente une transformation moléculaire de l'OTC à une substance toxique mais les résultats sont contradictoires sur le devenir de ces molécules. Ceci dit il serait intéressant de compléter l'étude par une cinétique de la température corrélée à l'action d'inhibition de ces antibiotiques et pour cela nous obligé de travaillé sur le devenir de la molécule après son exposition à la cinétique de température, et de faire identifié cette molécule toxique par la technique de spectrométrie d'absorbance atomique.



**ADEL REZGUI. (2009).** Analyse des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires en Tunisie : Les tétracyclines, les quinolones, et les sulfamides, mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de la licence appliquée en biotechnologie, université de la MANOUBA, institut supérieur de biotechnologie de SIDI THABET, page (14.15.16).

**AFSSA. (2005).** Spectres d'activité antimicrobienne répertoire de spectre valides par la commission d'autorisation de mise sur le marché.

**AFSSA. (2006).** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments .page(15).

**ALPHA AMADOU DIALLO. (2013).** Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire, thèse de doctorat, page(61).

**AMINATA DALLA SISSOKO. (2009).** Sensibilité et évolution de la résistance d'Escherichia coli aux antibiotiques au centre hospitalier et université du point. G, Thèse Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, pages (31-32-35).

**ANADON A., MARTINEZ., LARRANAGA MR. (1999).** Résidus of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. Livestock Production Science, pages (183–198).

**ANDREANNE LUPIEN. (2015).** Caractérisation génomique et phénotypique de la résistance aux antibiotiques chez *Streptococcus pneumoniae* ,thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire ,université laval, page (25).

## **B**

**BASSIROU FALL. (1999).** Evaluation de la prescription des antibiotiques dans la région KAOLACK, thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie (diplôme d'état), pages (31-35).

**BERNARD REMI. (2007).** Résistance à la Bacitracine chez *Bacillus subtilis*  
Thèse de doctorat spécialité : Microbiologie et Biotechnologies en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée, page (52).

**BIBAL DELPHINE. (2008).** L'impact des bêta-lactamines sur l'émergence d'entérobactéries résistantes dans la flore digestive chez le porc : caractérisation et stratégie de prévention, Thèse Doctorat de l'université de TOULOUSE, page(18).

**BOULTIF LATIFA. (2014-2015).** détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC), thèse présentée en vue de l'obtention du doctorat en sciences, université des FRERES MENTOURI de Constantine institut des sciences vétérinaires, pages (21-23-50-51).

## **C**

**CASFM. (2016).** Comité de l'antibiogramme de la SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE .Institut Pasteur Paris.

**CHAMS BEN AZZEDDINE. (2009).** Mise au point d'une méthode analytique de détermination des résidus de Sulfamides dans les œufs, rapport de stage du 01/07/09 AU 31/07/09, centre national des sciences et technologies nucléaires, faculté des Sciences de Tunis , page (25.26).

**CHEICKNA CISSE. (2012).** Étude structurale des aptamères peptidiques anti-Fur et de leur interaction avec leur cible .Thèse présenté pour obtenir le diplôme de doctorat

**CHEMELLE JULIE –ANNE. (2010).** Etude par modélisation moléculaire de l'effet allergène des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, tant sur le plan immédiat que retardé, thèse de doctorat, l'université de LYON, page (21).

## D

**DZIEDZIC E. (1988).** Les résidus de médicaments vétérinaires anthelminthiques, thèse : Méd. Vêt. Lyon, page (99).

## E

**ELBRAHMI REDOUANE. (2013).** Résistance naturel : profil épidémiologique et de résistance des bactéries multi résistantes au CHU HASSAN II de de doctorat fés, thèse N° 168/13, pages (6-13).

**ELENI SIOP. (2012).** L'activation des  $\alpha$ -secrétasses : une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement du traumatisme crânien, thèse de doctorat École Doctorale du Médicament (ED MTCE), page (79).

## F

**FANNY ROUTABOUL. (2011).** Hypersensibilité aux sulfamides antibactériens dans le syndrome de Stevens-Johnson, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, page (14).

**FAYCAL ELKHAOU. (2009).** Dépistage des résidus d'antibiotiques et développement d'un «NOUVEAU KIT » , la Recherche Scientifique et de la Technologie Université de Gabès Institut Supérieur de Biologie Appliquée de Médenine Rapport de Stage Master .

**FRANCOISE VAN BAMBEKE., SC. PHARM ., PAUL TULKENS. (2007-2008).** Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, université catholique de Louvain, pages (85-88).

**FRANJE CA., CHANG SK., SHYU CL., DAVIS JL., LEE YW., LEE RJ., CHANG CC., CHOU CC. (2010).** Differential heat stability of amphenicols characterized by structural degradation, mass spectrometry and antimicrobial activity. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, pages (869–877).

**FRANK DUPLEIX ., KHALENWOEMBE . (2013).** Analyse de l’usage des antibiotiques dans les élevages avicoles modernes de poules pondeuses de la région de l’ouest du Cameroun, thèse de doctorat N°08, page (51).

## G

**GRATACOS CUBARSI., M. FERNANDEZ GARCIA ., A. PICOUET ., P. VALERO PAMPLONA . (2007).** Formation of Tetracycline Degradation Products in Chicken and Pig Meat under Different Thermal Processing Conditions. Information Systems Division, National Agricultural Library.

## H

**HASSANI M ., LAZARO R ., Perez C., CONDON S., PAGAN R. (2008).** Thermostability of oxytetracycline, tetracyclines, and doxycycline at ultrahigh temperatures. Journal of Agricultural and Food Chemistry , pages (2676–2680).

**HAZAR ZIADI. (2010).** Essai d’amélioration du taux de rétention de la tétracycline dans un polymère à empreinte moléculaire formé de copolymères fonctionnalisés de l’acide lactique, Université de Montréal, Mémoire présenté à la Faculté de pharmacie En vue de l’obtention du grade de maître En sciences pharmaceutiques Option chimie médicinale ,pages (1-2).

## I

**IBRAHIM A., MOATS WA. (1994).** Effect of cooking procedures on oxytetracycline residues in lab muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry, pages (2561–2563).

**ISIDORI M. , LAVORGNA M . , NARDELLI A. (2005).** Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, pages (87–98).

## **J**

**JEAN CLAUDE KIOUBA (2002).** L'usage des antibiotiques en milieu hospitalier, thèse de doctorat, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie, page (15).

**JEAN LEDERER. (1986).** Encyclopédie moderne de l'hygiène alimentaire Tome II, Hygiène des aliments, 3e édition / Louvain : Nauwelaerts.

**JEAN LUC., ABOY MAROH. (2013).** Resistance bacterienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*, Thèse de doctorat, page(60).

## **K**

**KANTATY YENDUBE TOUGUELIGHAN. (2011).** Détection des résidus d'antibiotiques dans les viandes de bovins prélevées aux abattoirs de Dakar, mémoire de master qualité des aliments de l'homme, l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine vétérinaires (EISMV) de **Dakar**.

**KITTS DD., YU CW., BURT RG., MC ERLAN K. (1992)** .Oxytetracycline degradation in thermally processed. Journal of Agricultural and Food Chemistry, pages (1977–1981).

**KOCH .A.L. (2003).** Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research, (page 19).

**KOUDANDE O.D., SANDERS .P., LAURENTIE .M., MENSAH S.E.P ., MENSAH .G.A ., ABIOLA .F.A . (2014).** Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, Page(979).

## **L**

**LAI MICHEL. (2013).** Réévaluation des connaissances et représentation des parents d'enfants atteints de viroses saisonnières vis-à-vis de la prescription d'antibiotiques, thèse de doctorat, page(12).



**LEFEBVRE NICOLAS. (2005).** Thérapeutique des affections respiratoires des ruminants domestiques, thèse Pour le doctorat vétérinaire Présentée et soutenue publiquement devant la faculté de médecine de CRETEIL, pages (146-147).

**LEI TIAN ., SALMA KHALIL ., STEPHANE BAYEN .(2016).** Effet of thermal treatments on the degradation of antibiotic residues in food ,Critical Reviews in food Science and Nutrition.

## **M**

**MAKAN DIOURA. (2006-2007).** Sensibilité des bactéries pathogènes aux antibiotiques dans le district de BAMAKO, la faculté de médecine de pharmacie et d'Odonto-stomatologie du MALI.

**MARIE CLAUDE CHATELLET. (2007).** Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en ANJOU, thèse présenté pour obtenir le diplôme de doctorat. (Usage vétérinaire des antibiotiques), page (45).

**MEHDI SAADAOU. (2008).** Les transposons ; La fréquence des bactéries multi résistante a l'hôpital Hassan ii de Settat, thèse N° :13 présenté pour obtenir le grade de docteur, pages (51-52-56).

**MELANIE TRUDEL. (2015).** Étude et détection des gènes de résistance aux antibiotiques chez *Aeromonas salmonicida* sous-espèce salmonicida, mémoire, université laval (Canada), page(28).

**MENSAH. (2014).** Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de Vache produit dans le centre Benin. Journal of Applied Biosciences 80:7102 – 7112

**MICHEL BRIAND. (2002).** Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques .Masson, Paris, page (370).

**MICHEL LAURENTIE., CATHERINE CREFF- FROGER ., VALERIE GAUDIN .(2002) .** Surveillance des résidus d'antibiotiques. Apport des méthodes de spectrométrie de masse à l'identification des contaminants, pages (55, 283-294).

**M.K. HSIEH., C.L. SHYU., J.W. LIAO., C.A. FRANJE., Y. J. HUANG., S.K. CHANG. , P.Y. SHIH., C.C. CHOU. (2011).** Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity *Veterinari Medicina*, graduate Institute of Microbiology and Public Health, College of Veterinary Medicine, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan pages (274–285).

**MOUNIR HASSANI ZERROUK., REGINA LAZARO., CONSUELO PEREZ., RAFAEL PAGAN. (2008).**Thermostability of Oxytetracycline, Tetracycline, and Doxycycline at Ultrahigh Temperatures.

**M. QUOK TUC. (2012).** Transferts et comportements d'antibiotiques à l'échelle du bassin versant élémentaire, thèse de doctorat DINH Pour obtenir le grade de docteur de l'école pratique des hautes études, pages (28).

## **N**

**NAFISSATOU DIA. (1998)** .Sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées d'hémocultures au CHU Aristide le dantec, thèse N°55 pour obtenir le grade de docteur en pharmacie (diplôme d'état), université cheikh anta diop de DAKAR , faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie (Penicilinase) , page (13).

## **O**

**OKOMBE ., APPL BIOSCI . (2016).** Détection des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine bovine et aviaire commercialisées à Lubumbashi (RD Congo).

## **P**

**PAPANAGIOTOU EP., FLETOURIS DJ. , PSOMAS EI. (2005).** Effect of various heat treatments and cold storage on sulphamethazine residues stability in incurred piglet muscle and cow milk samples. *Analytica Chimica*, pages (305–309).

**PERITI. P., MAZZEI. T ., MINI . E ., NOVELLI . A. (1992).** Evaluation de la prescription

des antibiotiques dans la région de KAOLACK.

**PIERRIK LASSALS. (2012).** Etude de nouvelles méthodologies d'arylation directe en séries azole et pyridine – Application a la synthèse de cœurs de thiopeptides antibiotiques de la série, le Numéro National de Thèse : 2012 ISAM 0024, page(5).

## **R**

**RAMDANE MOHAMED SAID. (2015)** .Etudes qualitatives et quantitatives des résidus d'antibiotiques dans la viande de volaille et les œufs dans la région de la **Mitidja.**

Utilisation des probiotiques comme alternative .Thèse de doctorat, université MOULOUD MAMMARI DE TIZI OUZOU, page 100.

**RAMSERY JEREMIE. (2009-2010).** Guide d'Antibiothérapie Raisonnée des infections Bactériennes du Chien, thèse Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, page (26-33-111-105).

**RAPHAEL DELEPEE. (2003).** Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole, thèse de doctorat Ecole doctorale, Université de Nantes, pages (3-4-5-11).

**ROSE MD., BYGRAVE J., FARRINGTON WHH., SHEARER G. (1996).** The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxytetracycline. Food Additives and Contaminants , pages (275–286).

## S

**SAKO AGAICHATOU ASSAGAYE DICKO. (2010).** La qualité des Oxytétracyclines injectables à usage vétérinaire disponibles au Mali. Thèse présentée pour obtenir le diplôme de doctorat la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako, (page 13).

**SALAH H., ABOU RAYA., ALI R., SHALABY., NADIA A., SALAM ., WAFAA H., EMAM ., FATHY M., MEHAYA.(2013).** Effect of Ordinary Cooking Procedures on Tetracycline Residues in Chicken Meat Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza, Egypt. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 21, No. 1, Pages (80-86).

**SCIPPO M. L., MAGHUIN ROGISTER G. (2006).** Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse II, articles de synthèse, méthodes biologiques de dépistage . Méd. Vét, pages (150, 125-130).

**SEDRATI AMINA. (2014).** Etude de l'antibiorésistance des souches bactériennes à l'origine des infections infantiles à l'EPH d'Ouargla, page (13).

**SEKHRI – ARAFA NEDJOUA. (2010-2011).** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Soutenue, thèse Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences, pages (41-44-45-46-54-58-61).

**S.E.P. MENSAH ., O.D. KOUDANDE ., P. SANDERS. , M.LAURENTINE ., G.A MENSAH., F.A. ABIOLA.(2014).** Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique.

**SIBYLLE BEVILACQUA. (2011).** L'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy ,thèse Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de docteur de l'université HENRI POINCAR, pages (22-23).

**SINALY DOSSO (2014).** Analyse des pratiques avicoles et de l'usage des antibiotiques en aviculture moderne dans le département d'agnibilekrou, thèse de doctorat N° 13. Pages (25-40-41).

**SOPHIE ZIAI. (2014).** La résistance bactérienne aux antibiotiques : apparition et stratégies de lutte, thèse d'exercice pour le diplôme d'état docteur en pharmacie, université de limoges, faculté de pharmacie, pages (56-66-91).

**STEPHANIE COUMES FLORENS. (2011).** Les modules de "détection/résistance" aux antibiotiques peptidiques chez les Firmicutes, thèse de doctorat Spécialité : Microbiologie, en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée (Modification de pénétration), pages (86-88).

**STOLTZ REMI. (2008).** Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : évaluation et maîtrise de ce danger, thèse n° 97 pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, L'université CLAUDE-BERNARD LYON I (Médecine - Pharmacie), ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON, page (25).

## T

**TRAUB WH., LEONHARD B. (1995).** Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pages (149–154).

## V

**VALERIE. G., REGINE. F.(2012).** Screening Test for Antibiotic Residues, version 5.

**VALERIE GAUDIN. (2017).** Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires.

## Y

**YOUNESS EL ALJ. (2008).** LA prescription des antibiotiques en ambulatoire, Etude réalisée a la circonscription D'OULED OUJIH a Kenitra a propos de 505 cas, thèse N°: 28, pages (17-18).

## Z

**ZEBRO LAMOUNI HABIBATA. (2014).** Etude préliminaire sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages de poules pondeuses et la présence de résidus d'antibiotiques dans les œufs commercialisés à OUAGADOUGOU à (BURKINA FASO), thèse N° : 17

**ZINEB BELBEL. (2014).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba, thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat.

**ZOMAHOUN CARENE ., IREDE NADIA PRISCA .(2004) .** Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologies du centre national hospitalier universitaire –HBERT KOUTOUKOU MAGA de cotonou, pages (38-41-45).

