

Chapitre2 : Les résidus d'antibiotiques

1-Introduction

La production animale de masse (poulets de chair, poissons d'élevage...), l'utilisation très importante de médicaments vétérinaires : antibiotiques, antibactériens de synthèse, antiparasitaires internes et externes, le développement de la vente des denrées animales dans les grandes surfaces (anonyme) par rapport au commerce de proximité. L'internationalisation du commerce des denrées : viandes Brésil, crevettes Asie Sud-Est, miel Europe de l'Est. Les exigences de + en + grande consommateurs en matière de qualité des aliments. L'accroissement de la sensibilité des méthodes d'analyse et système d'alerte rapide. La médiatisation des scandales concernant les résidus (poulet aux antibiotiques, crevettes au chloramphénicol)⇒ *Résidus de médicaments vétérinaires : problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.*

2-Définitions

2.1. Définition des antibiotiques : Toute substance naturelle, de semi-synthèse ou de synthèse administrée par voie générale, douée d'une activité anti-bactérienne et antiparasitaire. Antibiotiques et antibactériens de synthèse : sulfamides, fluoroquinolones, nitroimidazoles. Antibiotiques antiparasitaires: ionophores, avermectines

2.2. Définition du résidu d'antibiotique (Règlement 2377/90 C.E.E) : Toutes les substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restant dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré.

2.3. Définition de LMRC.E.E. (1990) / la teneur maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, exprimée en **p.p.b.** sur la base du poids frais, que la communauté peut accepter comme légalement autorisé ou qui est reconnue comme acceptable dans des denrées alimentaires. [C] résidus faibles: p.p.b. (partie par milliard) ou **mg résidu /tonne denrée alimentaire.**

Le Comité Experts FAO/OMS, F.D.A. a fixé les L.M.R.s pour 200 principes actifs :

-Tissus (muscle, foie, rein, graisse) pour chaque espèce (bovins, ovins, volailles, poissons....)

- Productions (lait, oeuf, miel).

Exemple: Cefquinome (L.M.R. Bovins) : Reins : 200 ppb, Foie : 100 ppb ,Muscle : 50 ppb.

3- Evaluation de la toxicité des résidus d'antibiotiques

3-1 La concentration :

1. [C] résidus < L.M.R.s : substances règlementées

- Eleveurs : respect temps d'attente

2. [C] résidus > L.M.R.s

☐ β lactamines, doxycycline, fluoroquinolones, sulfamides: œufs

☐ Florfénicol, tulathromycine, ivermectine: lait

3. Pas de L.M.Rs. : Impossibilité fixer L.M.R.s. Résidus: risques santé consommateur.

Exp :Chloramphénicol, Nitrofurannes, Nitro-imidazoles⇒ interdiction utilisation

3-2 Nature et biodisponibilité

☐ Molécule

☐ Métabolites: toxicité > molécule mère

acide pénicilloïque : allergène

☐ Excipients : Action pharmacologique à la dose administrée (D.M.S.O.)

☐ - Persistance :Résidus pénicilloyl: persistance > 10 jours viande.

☐ Biodisponibilité varie selon formes résidus.

4-Classification

4.1. Classification des antibiotiques selon leurs origines

Les anti-infectieux peuvent être produits de trois façons, par fermentation (naturelle), par semi-synthèse ou par synthèse chimique.

4.1.1 fermentation ou extraction

Les antibiotiques sont fondamentalement des substances naturelles issues du métabolisme azoté de divers micro-organismes.

- soit des champignons inférieurs (mycètes) : du genre *Penicillium* pour les Pénicillines, *Griséofulvine* et genre *Céphalosporium* pour les Céphalosporines.

- soit des bactéries : du genre *Streptomyces* (90 % des antibiotiques sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*) et genre *Bacillus*. Comme antibiotiques dont l'origine est bactérienne on trouve, la Bacitracine, Polymyxine-Colistine, Mupirocine, Céphamycines, Monobactames (les Monobactames obtenues initialement par extraction, sont obtenues actuellement par synthèse).

4.1.2. semi-synthèse

Les antibiotiques ainsi produits par voie fermentaire sont parfois utilisés pour la préparation de dérivés artificiels voisins, mais qu'il est impossible de faire sécréter par la souche microbienne, même en recourant à des précurseurs.

Dans ce but, on fait subir certains traitements chimiques simples à des antibiotiques produits par voie fermentaire, notamment des hydrolyses pour séparer la partie fondamentale de la molécule, trop complexe pour être préparée par synthèse à un coût raisonnable ; on greffe ensuite sur ce squelette de base différents groupements particuliers grâce à des estérifications ou des amidifications.

4.1.3. synthèse chimique totale

Certains antibiotiques dont la structure est assez simple sont produits plus économiquement par synthèse que par fermentation. C'est le cas du Florphénicol, Chloramphénicol, Monobactames, et tous les agents antibactériens de synthèse : Sulfamides, Triméthoprime, Quinolones, Nitrofuranes, etc.

4.2. Classification des antibiotiques selon la structure chimique

Très variable, souvent une structure de base comme le cycle β -lactame (famille des Bêtalactamines) sur laquelle il y a hémi synthèse. Elle donne souvent, le nom à la famille.

4.3. Classification des antibiotiques selon la cible bactérienne

Selon la cible bactérienne au niveau de laquelle ils agissent, les antibiotiques peuvent être classés en quatre groupes :

4.3.1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne

Les antibiotiques agissant de cette façon sont soit des inhibiteurs sélectifs de synthèse de la paroi bactérienne grâce à leur ressemblance structurale avec les acides aminés sur lesquels agit la transpeptidase. Ils se fixent sur cet enzyme et inhibent son action, empêchant ainsi la formation des ponts poly-glycines du mucopeptide pariétal rigides, soit des inhibiteurs du transfert et de la polymérisation du mucopeptide pariétal, soit enfin des inhibiteurs de la première phase de l'utilisation de l'alanine au niveau de la paroi. Parmi ces antibiotiques on trouve les Bêta-lactamines, Vancomycine, Fosfomycine, et la Cyclosérine.

4.3.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

Ces antibiotiques agissent même sur les bactéries en phase de repos. Ils exercent une action directe et immédiate sur la membrane cytoplasmique. Cette action est

comparable à celle des antiseptiques actifs. Parmi ces antibiotiques, on trouve la tyrothricine, les polypeptides cycliques, poly myxines, colistine...etc.,

4.3.3. Antibiotiques agissant au niveau des ribosomes

Ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines bactériennes par action sur les Ribosomes.

- Inhibition au niveau des sous unités 30 S des ribosomes : Aminoglycosides (lecture de l'ARNm est perturbée),
- Inhibition au niveau des sous unités 50 S des ribosomes.

4.3.4. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse des acides Nucléiques

Nucléiques

- La réplication de l'ADN : inhibition de l'ADN-gyrase ou topoisomérase II (sous unité A), c'est le cas des quinolones
- La transcription de l'ARN : inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante (sous unité B), c'est le cas des rifamycines.

4.3.5. Antibiotiques agissant par autres mécanismes

Ces antibiotiques agissent en tant qu'antimétabolites bactériens en inhibant une des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries. C'est le cas des sulfamides, triméthoprim (qui inhibent la dihydroptéroate synthétase : DHPS), et l'isoniazide (analogues structuraux du NAD).

4.4. Classification des antibiotiques selon le spectre d'activité

Chaque antibiotique est caractérisé par un spectre qui correspond à l'éventail des germes qu'il peut toucher, à dose plus ou moins élevée. Il est différent pour chaque famille d'antibiotiques, bien qu'il puisse se recouper, en partie ou en totalité, avec celui d'autres antibiotiques, c'est à dire que les mêmes germes peuvent être sensibles à plusieurs antibiotiques à la fois. On a ainsi des antibiotiques à spectre très large, large, moyen, ou étroit.

5- Méthode de détection des antibiotiques dans les aliments

5-1. Méthode microbiologique de référence (METHODE DES 4 BOITES)

C'est la méthode officielle française de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande. Elle a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies gras.

***Principe de la méthode**

Elle est basée sur l'inhibition de la croissance de bactéries du genre *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*. Elle est réalisée au moyen de boîtes de Pétri contenant une gélose ensemencée avec la souche *Micrococcus luteus* ou la souche *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition dépourvues de colonies bactériennes autour des points de dépôts des échantillons (morceau de rein ou papier filtre imbibé d'exsudat de cortex rénal) sont révélatrices de la présence potentielle d'antibiotiques.

***Mode opératoire**

Cette méthode requiert l'utilisation des deux espèces suivantes : *Bacillus subtilis* cultivé à trois pH différents (6, 7,4 et 8) et *Micrococcus luteus* cultivé à pH 8. Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Bacillus subtilis* à pH 7,4, l'addition de triméthoprim permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie triméthoprim sulfamides.

Les principales étapes de cette méthode sont les suivants :

- Sortir les échantillons du congélateur, quelques minutes avant d'opérer, et les déposer sur un plateau en acier inoxydable
- Prélever sur chaque échantillon une carotte cylindrique de 8 mm de diamètre et de 2 cm de long environ, à l'aide d'un emporte-pièce
- Tout en poussant le cylindre de muscle hors de l'emporte-pièce, découpé à l'aide d'un bistouri huit rondelles de viande de 2 mm d'épaisseur
- Placer deux rondelles en positions diamétralement opposées sur chacune des quatre boîtes d'essai, en utilisant des pinces. Il est ainsi possible de déposer dans chacune de ces boîtes jusqu'à six rondelles, correspondant à trois échantillons à examiner, toutes ces rondelles devant se situer sur un cercle à environ 1 cm de la périphérie de la boîte.
- Pour chacune des quatre boîtes, sont considérés comme positifs, les échantillons de viande donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins

égale à 2 mm. Il faut recommencer l'essai chaque fois que le résultat semble douteux (pour un même échantillon une rondelle étant positive et l'autre négative, colonies éparses dans la zone d'inhibition, contaminations, etc). Si le second résultat n'est pas considéré comme positif, le résultat douteux doit être considéré.

Sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique, les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des quatre techniques de diffusion en gélose. De plus chaque boîte présente une sensibilité particulière pour certaines familles d'antibiotiques.

5-2- Méthode biochimique

5.2.1. Méthode enzymatique (PENZYME TEST)

Ce test qui sert pour la détection des résidus des antibiotiques de type Bétalactamines (test qualitatif) dans le lait a été adapté à la mise en évidence de ces résidus dans la viande toute en tirant parti de la propriété de l'hydroxylapatite d'adsorber les protéines à faible force ionique et à pH neutre. C'est un test enzymatique colorimétrique, basé sur l'inhibition d'une DD carboxypeptidase par les B-lactames. Il permet une estimation semi-quantitative des antibiotiques dans la viande à une concentration de 0.016 à 0.018 UI/G. L'application de ce test à la détermination des antibiotiques dans la viande est entravée par la présence des pigments rouges liés à des protéines (hémoglobine, myoglobine).

5-2-2 Principe du BETA STAR TEST

C'est un test du type Récepteur Assay. Il est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Il est très spécifique des Béta-lactamines (pénicillines et céphalosporines). Par contre, les concentrations élevées en résidus d'antibiotiques autres que les Béta-lactamines ont donné dans tous les cas des résultats positifs.

5.3. Méthode immunologique

Il existe plusieurs sortes de tests rapides immunologiques qui détectent les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. Sur le marché, les immuno-essais décrits pour l'analyse des antibiotiques sont répartis principalement en 2 groupes. Il y a les tests RIA (Radio Immuno Assay) et les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

6.Plans de contrôle des résidus d'antibiotiques dans la viande, les abats et les oeufs

En Afrique, les études actualisées relatives à la présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale sont très limitées. Par exemple: une étude sur les résidus d'antibiotiques dans la viande et les abats de poulets à Dakar au Sénégal a montré la présence de résidus de substances interdites comme le nitrofurane et le chloramphénicol dans les différentes matrices. Au Ghana, les taux de prévalence des résidus d'antibiotiques sont de 30,8 % pour la viande bovine, de 24 % pour la viande de mouton et de 6,8 % pour les oeufs.

7.Plans de contrôle des résidus d'antibiotiques dans le lait

En Algérie, 89,09 % des laits provenant des élevages des Wilayas, Blida, Alger, Tipaza et Médéa ont donné des résultats positifs lors du contrôle de résidus de tétracyclines et 65,46 % lors du contrôle de résidus de bêta-lactamines. Par ailleurs, environ 29 % des échantillons de lait produit dans l'Ouest algérien contiennent des résidus d'agents antibactériens. Dans l'Algérois, 9,87 % des échantillons de lait cru étaient contaminés par des résidus de pénicillines et/ou tétracyclines pour 97,33 % des échantillons positifs et de macrolides et/ou d'aminosides pour 2,67 % des prélèvements testés positifs.

8. Perturbation des industries laitières et fromagère

La présence des résidus d'antibiotiques cause :

- Une perte en industries laitières (**10 litres lait animal traité: perturbation fabrication 86.000 litres lait**) ++ centaines millions dollars chaque année
- Une inhibition des bactéries lactiques *Streptococcus .thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*: [C]: 0.02 µg pénicilline /ml lait :
 - ☐ Défaut d'acidification
 - ☐ Défaut d'arôme
 - ☐ Flores indésirables
- Une perturbation fabrication yaourt : Goût de peptone, quantité anormale lactosérum en surface.
- Une perturbation fabrication fromage : Mauvais rendement à la coagulation, mauvais égouttage, gonflement précoce, perturbation de la flore d'affinage.