

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun- Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

BRAHIM SOUHIR

GHEROUS ILHEM SAIDA

KHALED KHODJA KHADIDJA

Thème

Contribution à la détection de *Clostridium sulfito-réducteur* et des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet.

Soutenu le 12-07-2021.

Jury:

Président: M^r HOCINE L

Encadrant: M^{me} HARICHE Z

Examineur: MAKHLOUFI C

Grade

MCA

MAB

MCA

U. Tiaret

U. Tiaret

U. Tiaret

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Dieu dit:

{ وَإِذْ تَأْتِيَنَّكُمْ رِجَالٌ لَّيِّنٌ أَذَاتُ لَئِنِ لَّمْ يَظْهَرِ عَلَيْكُمْ إِذْ هُمْ يَنْصَلُونَ إِذْ يَأْتِيَنَّكُمْ لَيُنَبَّيْنَنَّكُمْ وَالَّذِينَ لَا يَرْجُونَ عِزِّيَ أَجْرًا مُّجْتَمِعِينَ } (Verset 07 Sourate Ibrahim)

(Verset 07 Sourate Ibrahim)

Louange à Dieu qui nous a montré le chemin de la science et de la connaissance et nous a aidés à accomplir cette tâche et nous a aidés à finir ce travail, comme l'indique l'impact :

qui ne peut pas remercier personne ne peut pas remercier Dieu.

Que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain, la réalisation de ce mémoire fut pour nous une expérience d'une immense valeur.

Scientifiquement, ces mois ont représenté une opportunité précieuse d'apprendre un peu davantage sur les procédés microbiologiques et de découvrir. Humainement, cette période a été marquée par énormes amitiés, de résilience et d'humilité scientifique.

Ainsi, nous ne pouvons que remercier tous ceux qui étaient à nos côtés au cours de cette expérience.

Nous remercions, du fond du cœur, nos familles et ami(e)s respectifs, qui nous ont toujours soutenus, épaulés et qui ont cru en nous.

Nos vifs remerciements et profonde reconnaissance vont :

A notre promotrice M^{me} HARICHA ZAHIRA pour avoir nous guidés dans ce travail, ainsi que pour sa patience, sa disponibilité permanente, sa gentillesse et pour ses précieux conseils.

Les membres du jury : M^r HOCINE L et M^{me} MAKHLOUFI C, qui nous ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer notre travail.

Aux personnels du laboratoire d'hygiène et pathologie animale, de l'institut des sciences vétérinaires surtout M^r MUSTAPHA.

A tous les enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret

Nous remercions aussi ARBI BAHY de la résidence universitaire qui nous a aidés beaucoup.

Enfin, il nous est fort agréable d'exprimer nos remerciements les plus sincères aux nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la bonne réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...?.

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,

Le respect, la reconnaissance...?

*Avant tous, je remercie ALLAH qui m'a éclairé le chemin du savoir et qui m'a
donné la volonté d'achever ce travail.*

Ainsi, c'est tout simplement que

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

*A mon cher père **ABD EL KADER** qui a su se montrer patient, compréhensif et
encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand
confort.*

*A ma chère mère qui n'a jamais cessé de faire ses efforts pour que j'atteigne ce
niveau. Vous êtes l'exemple qui ne cessera jamais de m'encourager*

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

*A mes chers frères **NASR EL DINE** et **BILAL** et ma sœur **LWIZA** que dieu vous
garde et vous protège que votre chemin soit plein de succès.*

*A mes meilleurs amis, **GHANIA**, **RADJAA**, **TORKIA**, **IKRAM**, **FATIMA** et
HICHEM avec lesquelles j'ai partagé mes plus beaux moments, mes partenaires
ILHEM et **KHADIDJA** avec laquelle j'ai surmonté tous les obstacles, sans oublier
mes amis de la fac sans exception.*

*A tous les membres de ma famille pour leur aide et leur soutien que dieu vous
protège et vous préserve.*

SOUHIR.

Dédicace

Je tiens c'est avec grande plaisir que je dédie ce modeste travail :

A ma maman qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études

Qu'elle trouvé ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A mon cher per **AMEUR**, mon frère **MOHAMED** mes sœurs qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de se travail .ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*

A mes amies son exception a qui je souhaite plus de succès

*A mes collègues : **KHADJIDJA, SOUHIR***

A tous ceux que j'aime

ILHEM.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents. Pour tout ce que vous avez fait pour moi, tout ce que le mot « merci » ne pourra jamais exprimer, Vous m'avez préparé au monde et vous m'en avez ouvert les portes, et c'est avec émotion que je vous exprime toute mon affection

*A mes sœurs **KELTOUM**, **FAIZA**, **MAROUA**, **FATIMA** et mon frère **KHALED**,
merci de remplir ma vie de joie et de bonheur*

A toute ma famille

*A ma petite famille mon mari **IDRIS** et mon fils **AHMED NADJEM EDDINE**,
merci pour le soutien et la pascience*

*A mon amie **MAROUA**.*

*A mes chères collègues **SOUHIR** et **ILHEM**.*

A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

KHADIDJA.

Liste des abréviations

% : pourcentage.

° : degré.

°C : degré Celsius.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AFSSA: Agence Française pour la Sécurité Sanitaires des Aliments.

API: appareillage et procédé d'identification.

ARF: antibiotiques régulateur de flore.

ATB : antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BC: *Bacillus cereus*.

cm : centimètre.

CRS : *Clostridium Sulfito Réducteurs*.

DO : densité optique.

EC: *Escherchia coli*.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

g: gramme.

GN : Gélose nutritive.

h: heure.

I : intermédiaire.

l: litre.

LMR : Limite Maximale des Résidus.

MH: Muller Hinton.

min: minute.

ML: *Micrococcus luteus*.

ml: millilitre.

mm: millimètre.

nm: nanomètre.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

pH: potentiel hydrogène.

PS : *Pseudomonas*.

R : Résistance.

S : Sensibilité.

SM : Solution mère.

ST : *Staphylococcus aureus*.

T° : température.

TSE: sel eau tréptone.

VF : Gélose viande foie.

µg : Microgramme.

µl : microlitre.

Liste des figures

Figure 01: échantillon de bréchet, cuisse congelé dans un sac stérile.	10
Figure 02: Etapes de préparation des échantillons de viande.	11
Figure 03: Recherche des <i>Clostridium Sulfito-réducteurs</i>	13
Figure 04: Protocole expérimental.	14
Figure 05: Ensemencement des souches.	15
Figure 06: Réaction des bactéries vis avis aux antibiotiques.	17
Figure 07: Recherche des résidus d' ATB par la méthode de puits.....	18
Figure 08: Prévalence de contamination de la viande de poulet par <i>Clostridium sulfiro-réducteur</i>	20
Figure 09: Absence/présence des colonies de <i>Clostridium sulfiro-réducteur</i> dans la viande de poulet.	20
Figure 10: Aspect macroscopiques des souches utilisées.....	22
Figure 11: Antibiogramme de souches utilisées.....	26
Figure 12: Résultats de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet.	28

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification phylogéniques de clostridium.....	3
Tableau 02: origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées.....	8
Tableau 03: Appareils et produits utilisés dans ce travail.	10
Tableau 04: Caractéristiques microscopiques des souches utilisées après coloration de Gram.	23
Tableau 05: Résultats des tests biochimiques des souches; <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> réalisés manuellement.....	24
Tableau 06: diamètre des zones d'inhibition en mm des souches bactériennes utilisées.	26
Tableau 07: Phénotypes d'antibiogramme des souches bactériennes testées.....	27

Résultats et discussion	20
III.I. Détection de <i>Clostridium sulfito-réducteur</i> (CRS).....	20
III.II. Recherche des résidus d'antibiotiques	22
III.II.1. Résultats de vérification de la pureté des souches bactériennes utilisées	22
III.II.1.A. Caractéristiques macroscopiques	22
III.II.1.B. Caractéristiques microscopiques	23
III.II.1.C. Caractéristiques biochimiques	24
III.II.2. Résultats de détection les souches sensibles vis-à-vis certains antibiotiques (Témoin positif).....	25
III.II.3. Résultats des tests des échantillons (méthode de 4 boîtes)	27
Conclusion	
Références bibliographiques	
Résumé	

Introduction

Introduction

La volaille est le principal facteur de croissance de la production de viande, essentiellement sous l'effet de l'augmentation de la demande mondiale de cette source de protéine animale. Les coûts de production et les prix de ce produit ont contribué à faire de la volaille, la viande préférée des producteurs et des consommateurs dans le monde et surtout dans les pays en développement (**FAO, 2016**).

En Algérie, la filière avicole « chair » a connu depuis 1980 un développement notable, soutenu par une politique incitative. Cependant, les pratiques d'élevage et d'abattage accusent un retard technologique considérable par rapport aux pays industrialisés, ceci retentissant non seulement sur la productivité des ateliers avicoles, mais aussi et surtout sur la santé publique. En effet, la problématique de la filière avicole sur le plan sanitaire reste toujours tributaire des conditions d'élevage en général, et plus particulièrement de l'hygiène des bâtiments (**Elgroud, 2009**).

La qualité hygiénique de la viande constitue l'exigence élémentaire du consommateur. Elle peut être altérée par la prolifération de microorganismes néfastes, de parasites et/ou la présence de composés toxiques ou néfastes pour la santé (**Chougui, 2015**).

Dans l'élevage de volailles, les agriculteurs utilisent plusieurs variétés de produits tels que les stéroïdes anabolisants, les tranquillisants et beaucoup plus les antibiotiques qui sont utilisés soit en tant que promoteurs de croissance pour augmenter les rendements de production ou en tant que remèdes thérapeutiques pour traiter et prévenir contre les maladies spécifiques (**Hakem et al., 2013**). Les mêmes derniers auteurs soulignent que le non-respect du délai d'attente peut conduire à la contamination des aliments. La présence de résidus d'antibiotiques peut avoir des effets néfastes sur la santé publique, ce qui provoque des réactions allergiques chez les personnes déjà sensibilisées. Ajoutant à cela, les mauvaises pratiques fondées sur l'utilisation d'antibiotiques qui peut sélectionner des souches de bactéries pathogènes multi-résistantes, ou la transmission de ces dernières aux humains se fait par l'alimentation (**Andermont, 2000; Lee et al., 2000; Rogister, 2000; Toldra et Reig, 2008**).

De ce fait, l'objectif de notre étude est la détection de *Clostridium sulfito-réducteur* et les résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet, afin d'évaluer le risque de ces derniers sur la santé des consommateurs.

Chapitre I

Partie
bibliographique

I. Généralités sur les viandes

I.1. Définition de la viande

Les viandes, selon l'organisme Mondiale de la Santé Animale (OIE) désigne toutes les parties comestibles d'un animal, dans ce contexte désigne tout mammifère ou oiseau (OIE, 2010). La viande pourrait donc être définie comme l'ensemble des aliments d'animaux constitués par les tissus musculaires associé à du gras, des nerfs et du sang, ainsi que de la triperie et des abats.

I.1.2. Définition de la viande blanche

La viande blanche (poulet, dinde...etc.) est une protéine animale présentant autant de qualités nutritive que la viande rouge (ovine, bovine), dans le passé cette protéine était qualifié de viande des pauvres (Boukhalfa, 2006).

I.3. Importance

L'aviculture prend une place de choix dans les plans de développement de nombreuses nations tant pour des raisons nutritionnelles et économiques que de gout. Parmi les nutriments indispensables à la vie figure les matières azotées et plus particulièrement celle d'origine animale l'azote peut être apporté par les viandes dont celles de volailles (Ndiaye, 2002).

I.4. Facteurs susceptibles d'influencer la qualité des poulets

Sauveur (1997) et Mary (1998) ont repris les études analysant les principaux facteurs influençant la qualité du poulet. Au sens large, ils peuvent être classés en facteurs intrinsèques à l'animal (l'âge à l'abattage, le génotype et le sexe) et facteurs extrinsèques (l'alimentation, les conditions de transport et d'abattage).

II. *Clostridium sulfito-reducteurs*

Ils regroupent des espèces de clostridia telles que *perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium nooyi*, *Clostridium fallax*,...,ils sont ainsi dénommées car ils sont capables de réduire les sulfites (sulfite de sodium ,par exemple) présent dans le milieu de culture en sulfure, ceux-ci se combinent avec un sel de fer pour donner du

fer noir, les colonies noir entourées d'un halo noir sont caractéristiques des bactéries sulfito-réductrices (**Dellaras,2014**).

Les *Clostridia*, bactéries gram positif, anaérobies sporulées comprennent plus de 150 espèces (**Bergey's Manuel, 2014**).

Tableau 01: Classification phylogéniques de clostridium.

Domaine	Bactéria ou Eubactéria
Phylum	Firmicutes ou bactérie à gram+
Classe	Clostridia
Ordre	Clostridiales
Famille	19 familles dont la famille I des clostridiaceae

Dans la famille des clostridiaceae: 13 genres dont le genre clostridium.

II.1. Caractéristiques

Le genre *Clostridium* de la famille des *Clostridiaceae*, regroupe des bactéries gram positif sporulés apparaissent sous leurs forme végétative comme des bacilles en paires ou en chainettes cortés (**Poxton, 2006; Johnson et al., 2007**).

Les espèces pathogènes ne sont pas envahissantes, toute fois, certaines souche de clostridium produisent des toxines qui provoquent des symptômes et des lésions associés à une infection, comme la nécrose des tissus (*Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*) ou le botulisme (*Clostridium botulinum*) (**Popoff et al., 2009**).

Les bactéries du genre clostridium peuvent être présentes dans le sol, les excréments, les eaux usées et les sédiments marins (**Johnson et al., 2007**).

Période d'incubation de 6 heures à 3 jours en cas de myonécrose a clostridium.

Gamme d'hôte ; Tractus gastro-intestinal des vertébrés et des invertébrés (**Poxton, 2006**).

Les bactéries du genre clostridium forment des endospores résistantes dans l'environnement pour survie l'extérieur de l'hôte.

II.2. Sensibilité aux médicaments

Les bactéries du genre *Clostridium* présentent une sensibilité variable aux antibiotiques (**Johnson et al., 2007; Brook, 2009**), cependant la plupart des espèces sont sensible au : pénicilline, clindamycine, chloromphénicol, pépiracilline et au métronidasole (**Ouderdouk et al., 2009 ; Spelman , 2011**).

II.3. Sensibilité aux désinfectants

Les spores sont résistantes a la plus part des désinfectants et en cas de sensibilité leur inactivation nécessite l'emploi de temps de contact prolongés (**Rutala, 1996 ; Russel , 2001**).

II.4. Inactivation physique

Les spores de *Clostridium* sont généralement résistantes à la chaleur (**Ryan, 2004**) et peuvent survivre pendant 3 heures à une température de 116°C, tandis que la forme végétative peut être rapidement inactivée par des températures de seulement 55°C et 65°C (**Hoyt et al., 1938**), les spores seront aussi sensibles a une chaleur humide de 100°C pendant 29 minutes sous un pH de 7 et pendant 11 minutes sous un pH de 10,2 ou de 4,1(**Schneierson, 1972**).

III. Généralité sur les antibiotiques**III.1. Définition des antibiotiques**

Les antibiotiques sont les agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ils agissent à faible dose pour inhiber la croissance des microorganismes pour les détruire. Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et hémi-synthèse (**Démoré et al., 2012**).

III.2. Usage des antibiotiques en élevage vétérinaire**III.2.A. Usage à titre thérapeutique curatif**

Les antibiotiques peuvent être utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité (**Zanditans, 1999**).

III.2.B. Usage en métaphylaxie

Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage de grands effectifs et évolue sur un mode aigu avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer les bactéries, l'ensemble de groupe d'animaux est traité (Mailard, 2002).

III.2.C. Usage en tant qu'additifs dans l'alimentation animale

L'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs est très limité actuellement. Les antibiotiques régulateurs de flore (ARF) ou antibiotiques promoteurs de croissance 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 (Afssa, 2006).

III.3. L'administration d'un médicament antibiotique

Les antibiotiques peuvent être administrés par voie orale ou parentérale mais aussi par voie locale : pommade, oblets gynécologiques et surtout préparation intramammaires qui sont très largement utilisés pour le traitement des mammites des ruminants (Stolz, 2008).

III.4. Résidus des antibiotiques

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux, antibiotique reçue par l'animal de son vivant (stolz, 2008).

III.5. Limite maximale de résidus (LMR)

La LMR correspond à la concentration maximale en résidus, résultats de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires. (Laurentie et Sanders, 2002).

III.6. Conséquences liées à la présence des résidus d'antibiotiques dans l'alimentation

Les résidus étant le plus souvent présents en quantités très faibles, de l'ordre de microgramme (ug) comme l'indiquent les LMR, leur toxicité semble corrélée à une

exposition chronique (consommation de denrées contaminées sur de longues périodes) (Jeon et al., 2008).

III.6.1. Risques allergiques

Les réactions allergiques de types III caractérisées par des réactions de type de fièvre induite ainsi que par la possibilité de rash érythémateux, sont les plus fréquentes dans les cas d'exposition aux résidus (Nicha, 2008).

III.6.2. Sélection de germes résistants aux antibiotiques

Constitue pour sa part un véritable problème de santé publique, car ce phénomène réduit considérablement les Possibilités thérapeutique, les résidus d'antibiotiques entraîneraient une sélection des souches bactériennes résistantes dans le tractus gastro-intestinal, des consommateurs (Gerniglia et Kotarsk, 2005).

III.6.3. Risques cancérogènes

Il semble associé aux résidus de deux familles d'antibiotiques principalement: les nitrofuranes et les nitromidazoles. En effet, les résidus provenant des réactions de nitro-réduction de ces antibiotiques sont fortement électrophiles et donc capables de réagir avec l'ADN (Stolz, 2008).

III.7. Méthodes de détection des résidus des antibiotiques

III.7.1. Test de dépistage

Ils son qualitatifs, et les échantillons contrôlés positifs sont ceux contenant des résidus même à des teneurs inférieures aux LMR. Parmi les tests de dépistage, on distingue les tests biologiques et les tests physico-chimiques (Kanati, 2011).

III.7.1.1. Tests biologiques

Les tests biologiques sont basés sur la croissance ou l'inhibition d'une culture bactérienne. En présence de résidus dans les denrées, 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*) et (*Micrococcus luteus*). (Fabre et al., 2004).

Comme inconvénients ces tests ne permettent pas de connaître ni les teneurs, ni la nature exacte de la molécule présente dans les échantillons analysés. On peut citer dans cette catégorie de tests la méthode officielle des quatre boîtes, le PremiTest, et leurs variantes améliorées sous forme de Kits plus rapides et adaptés aux échantillons de masse (**Kanati, 2011**).

III.7.1.1.A. Méthodes de PremiTest

Le PremiTest est un test basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus* inclus dans la gélose nutritive. Cette bactérie est sensible à de nombreuses familles d'antibiotiques et aux Sulfamides (**Popelka et al., 2005**).

III.7.1.1.B. Méthodes de 4 boîtes

Cette méthode requiert l'utilisation des deux espèces suivantes *Bacillus subtilis* cultivée à trois pH différentes (6, 7,2 et 8) et *Micrococcus lutens* cultivée à pH 8 pour La méthode de diffusion réalisées avec *Bacillus subtilis* a pH 7,2, l'addition de triméthoprime permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie triméthoprime Sulfamides (**Gaudine et al.,2006**).

III.7.1.2. Les tests physico-chimiques

Ce sont des tests essentiellement de nature enzymatique, immunologique et parfois chromatographique.

Les méthodes enzymatiques ont pour principe l'inhibition d'une enzyme en présence d'un résidu d'antibiotique spécifique (**Brouillet, 2002**).

III.7.2.Les tests de confirmation

Comme l'indique leur nom, ce sont des tests qui viennent confirmer les résultats des tests de dépistage, Ils permettent d'identifier formellement la molécule de résidus présente dans la denrée et sa teneur exacte. (**Delpine et al., 2002**).

Ces tests de confirmation sont cependant très coûteux en temps, en matériels et en réactifs et nécessitent un personnel bien formé. Ils sont donc le plus souvent délaissés au profit des tests de dépistage permettent des prises de décision rapides (**Kanati, 2011**).

Chapitre II

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

➤ Objectif du travail

Ce travail a pour objectif de détecter la présence de *Clostridium sulfito-réducteur* et des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet ou ces germes et ces substances peuvent poser un grand problème sur la sante publique.

➤ Lieu et durée du travail

Les analyses des échantillons ont été réalisées au sein du laboratoire de Microbiologie du département des sciences de la nature et de la vie de la faculté des sciences et le laboratoire de recherche « hygiène et pathologie animale » de l'institut des sciences vétérinaire de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret depuis le 21 Avril 2021 jusqu'au 21 juin 2021.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Souches bactériennes

Les souches utilisées dans cette étude sont : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Micrococcus luteus* ATCC 14452, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ces bactéries nous permettent la mise en évidence des résidus de substances à activité antibactérienne.

Tableau 02: origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées.

Souches	Origine de la souche	Milieu de culture	T° de croissance
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Laboratoire de la recherche « hygiène et pathologie animale » de l'institut des sciences vétérinaire de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret.	Muller Hinton	37°C
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14452			

<i>Escherichia coli</i>	Laboratoire de Microbiologie du département des sciences de la nature et de la vie de la faculté des sciences l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret.	Mac Conkey	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>		Chapman	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Cétrimide	

II.1.1.2. Les disques d'antibiotiques

- Pénicilline G (P) 10 µg.
- Erythromycine (Ery) 15 µg.
- Ticarciline (TIC) 75 µg.
- Gentamycine (CN) 10 µg.
- Colistine Sulfate (CS) 1 µg.
- Oxacilline (OX) 1 µg.
- Streptomycine (S) 10 µg.
- Metronidazole (MT) 5 µg.
- Tétracycline (TE) 30 µg.

II.1.2. Echantillonnage et conservation

Le présent travail a été effectué sur vingt-et-un échantillons de viandes de poulet ou l'achat de ces derniers se fait aléatoirement et aseptiquement à partir des différentes boucheries de la wilaya de Tiaret (Frenda, Mehdia, Tiaret) et acheter au hasard.

La détection de *Clostridium sulfito-réducteur* se fait immédiatement après l'arrivée des échantillons au niveau de laboratoire à partir des ailes, des cuisses et bréchets. Pour la recherche des résidus d'ATB les échantillons (cuisses et bréchets) sont codifiés et conservés dans des sachets stériles au congélateur à une température de -4°C jusqu'à leur utilisation au laboratoire.



Figure 01: échantillon de bréchet, cuisse congelé dans un sac stérile.

II.1.3. Appareils et produits

Tableau 03: Appareils et produits utilisés dans ce travail.

Appareils	Produits chimiques et milieux de culture	Autres
Balance électronique	Sulfite de sodium, L'alune de fer	Bec bunsen
Autoclave	Huile de paraffine	Pince stérile, Barreau magnétique
Étuve	L'eau physiologique, TSE	Mortier stérile
Bain marie	Viande foie	Micropipette, Pipettes Pasteur stériles
Réfrigérateur	Coloration de Gram, Galerie API 20	Lames et lamelles, Anse de platine
Spectrophotomètre	Solution Ringer	Cuves pour spectrophotomètre
Microscope optique	Muller Hinton MH	Boîtes pétri
Agitateur magnétique	Gélose nutritive	Béchers, Flacons, Tubes à essais
Incubateur	Mac Conkey	Ecouvillons
Centrifugeuse	Chapman	Pipettes graduées
Vortex	Cétrimide	Sachets stériles

II.2 Expérimentation au laboratoire

Ce travail est constitué de deux volets, le premier est la détection de *Clostridium sulfito-réducteur* dans la viande de poulet et le deuxième est conçu pour la recherche des résidus d'antibiotiques par la méthode de quatre boîtes dont le principe est l'inhibition de la croissance bactérienne par l'utilisation de cinq souches.

II.2.1. Détection des *Clostridium Sulfito Réducteurs* (CRS)

II.2.1.1 Préparation des échantillons

➤ Préparation de solution mère

- 25 g d'échantillons ont été prélevés du bréchet, cuisses et ailes (5g de chaque partie) selon la norme **AFNOR NF V08-403**.
- Broyer avec un mortier stérile contenant 225 ml de TSE.
- Les échantillons sont déposés dans des tubes en verre stériles et ils sont centrifugés à 4.000 tours pendant 5 minutes. Une quantité du surnageant est récupéré pour les dilutions (**figure 02**).



Figure 02: Etapes de préparation des échantillons de viande.

➤ Préparation des dilutions (Azzizi, 1998)

- Introduire 1 ml de la solution mère et homogénéiser dans 9 ml de TSE dans des tubes stériles, ensuite de série de dilution décimale (10^{-1} , 10^{-2}) sont effectuées.
- Prélève 5ml de chaque dilution et de solution mère, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre à 80°C pendant 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des bactéries anaérobies *sulfito-réductrices* éventuellement présentes et d'activer les sports. Puis refroidir immédiatement à l'eau de robinet.
- Par la suite ajouter 18 ml de gélose Viande Foie fondue puis refroidis à 45°C à laquelle est additionné le sulfite de sodium (0,5 ml) et l'alun de fer (04 gouttes) qui sont répartis et bien mélanger dans les tubes.

- Homogénéiser parfaitement le milieu et l'inoculum en évitant d'incorporer l'air.
- Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes.
- Ajouter ensuite quelques gouttes de l'huile de paraffine à la surface de chaque tube afin de créer l'anaérobiose.
- L'incubation se fait à 46°C pendant 48 heures.

➤ **Lecture**

Les *sulfito-réducteurs* se développent sous forme de grosses colonies noires dues à la réduction des sulfites qui précipitent avec les ions de fer, chaque colonie noire est issue d'une spore.

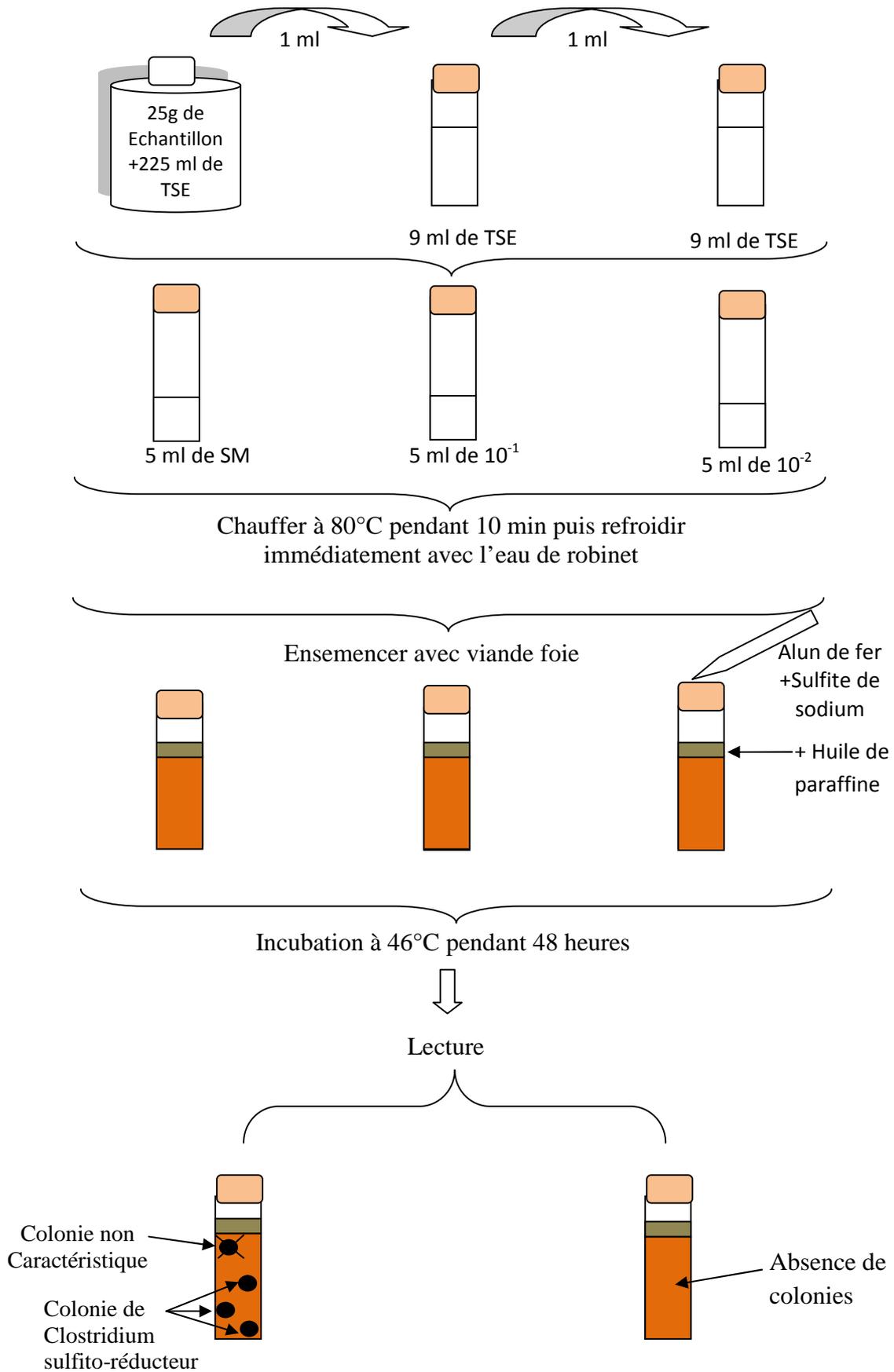


Figure 03: Recherche des *Clostridium Sulfito-réducteurs*.

II.2.2 Recherche des antibiotiques

Ce travail a demandé d'étudier l'inhibition de la croissance bactérienne des souches utilisées pour détecter la présence des résidus d'ATB par la méthode de référence LMR/90/01 version 4 ou la méthode de quatre boîtes (AFSSA, 2006).

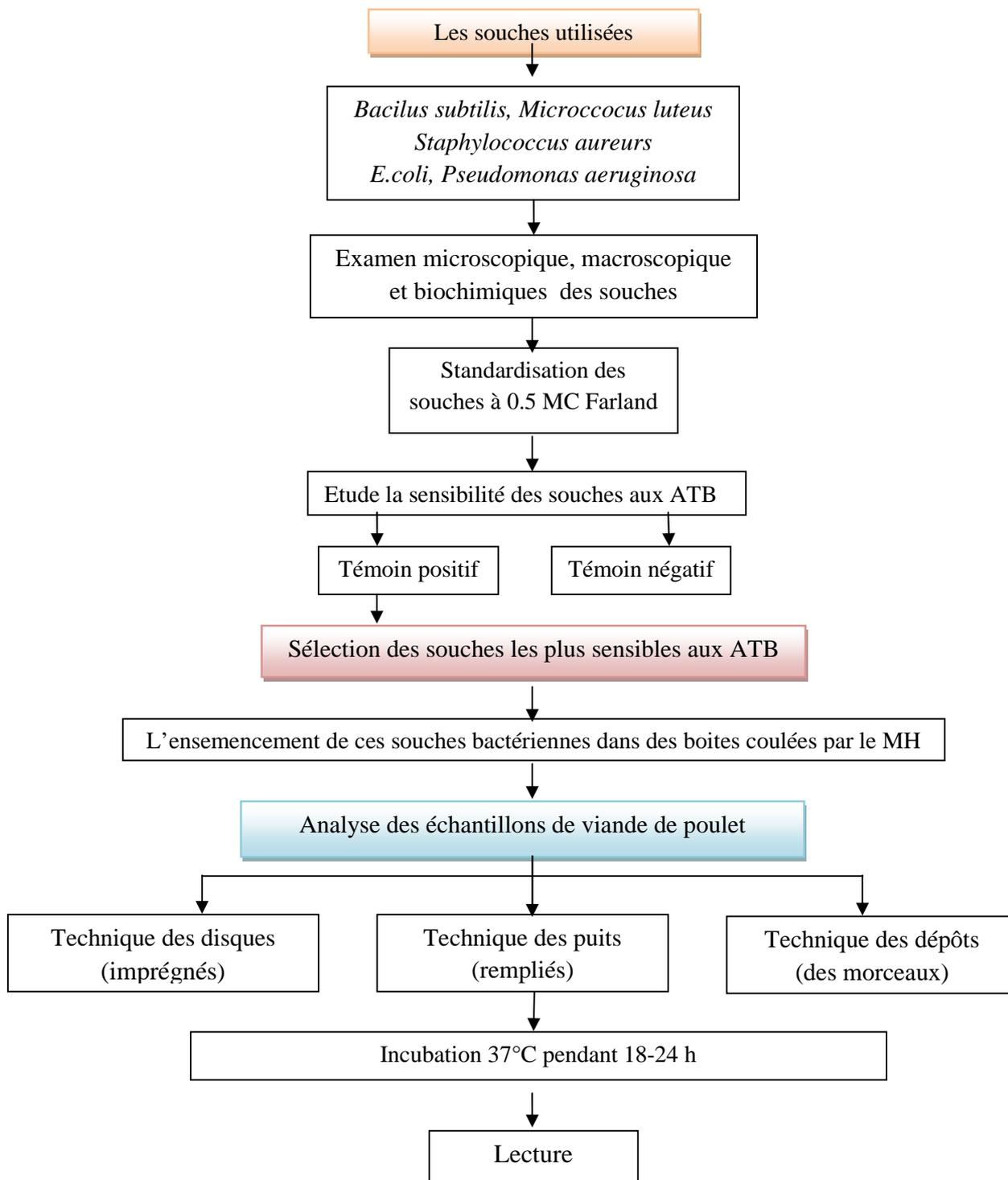


Figure 04: Protocole expérimental.

II.2.2.1 Vérification de la pureté des souches

La vérification de la pureté des souches se fait sur le milieu gélose Nutritive (GN) (**Annexe I**) par la méthode d'ensemencement en quadrant qui est référenciée dans les procédures microbiologique tout en on incubant les boites à 37°C pendant 18 à 24 heures ainsi une coloration de Gram et des tests biochimiques est réalisée pour compléter cette vérification.



Figure 05: Ensemencement des souches.

II.2.2.2 Détection des souches sensibles aux antibiotiques

II.2.2.2.1 Préparation de l'inoculum

- Après 24h d'incubation, nous prélevons 3 à 4 colonies de chaque boîte Pétri (de chaque souche) par une anse stérile et nous la déchargeons dans 10 ml d'eau physiologique stérile 90%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne par le vortex.
- Régler l'opacité à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm par le spectrophotomètre qui est équivalent à 0.5 Mac Farland.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum (OMS, 2005).

II.2.2.2.2 Témoin positif et négatif

A. Témoin négatif

La procédure suivie dans notre étude est la suivante :

- Fondre la gélose Muller Hinton dans un bain marie.
- Laisser refroidir la gélose à 45°C.

- Couler environ 15 ml de milieu de culture MH (**Annexe I**) dans les boîtes de Pétri vides et laisser la gélose solidifier.
- Inoculer chaque boîte avec un écouvillon stérile qui est trempé dans la suspension bactérienne pour toutes les souches utilisées puis le frotter sur la totalité de la surface gélosée sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération en tournant la boîte de 90°, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la boîte.
- Incuber à 37° pendant 18-24h.

B. Témoin positif

➤ **Technique utilisée d'ensemencement**

On répète la même opération de témoin négatif mais dans ce cas on dépose les disques d'antibiotiques choisis dans cette étude (déjà mentionnés) à l'aide d'une pince flambée et refroidie, tout en respectant la distance de 2 à 2,5 cm entre les disques et 1 cm de bord de la boîte.

Assurer la pré-diffusion en laissant les boîtes une demi-heure à une heure à la température de laboratoire puis les incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

C. Lecture

Après incubation, la mesure des zones d'inhibition autour de chaque disque d'ATB, nous permet de déterminer le comportement de chaque souche vis-à-vis de ces derniers dont on détermine si elle est sensible, intermédiaire ou résistante en se référant aux valeurs données par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

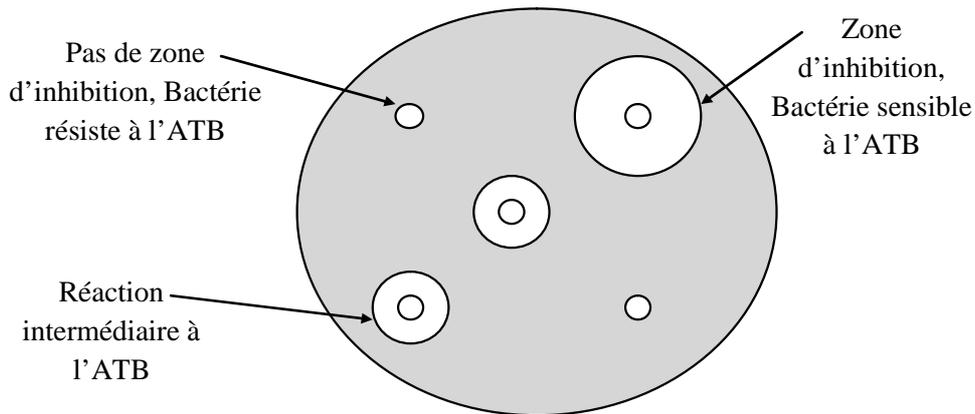


Figure 06: Réaction des bactéries vis avis aux antibiotiques.

II.2.2.3. Détection des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet

➤ Préparation des échantillons et des boîtes de pétri

Les échantillons congelés sont décongelés à l'air libre ou la recherche des résidus d'ATB est effectuée directement dans les morceaux de viande et dans l'exsudat de ces derniers ou nous avons suivi les procédures suivantes:

- Découper les échantillons sous formes des disques de 08 mm de diamètres et 02 mm d'épaisseur pour les déposer directement dans les boîtes.
- 5 g de chaque échantillon est prélevé, pesé et broyé avec un mortier stérile contenant 45 ml d'une solution Ringer stérilisé (**Annexe I**) ensuite ils sont déposés dans des tubes en verre stériles et ils sont centrifugés à 4.000 tours pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré pour remplir les puits et imbibé les disques du papier de Whatman déposé dans les boîtes.
- Le milieu MH (**Annexe I**) est coulé dans les boîtes de Pétri et est ensemencé avec les germes les plus sensibles.
- Chaque échantillon est analysé avec chaque souche sensible.

II.2.2.3.A. Méthode des puits

Des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et remplis avec l'exsudat des viandes. Nous avons réalisé deux répétitions pour chaque échantillon, donc dans une boîte de Pétri, deux puits à gauche correspondant à la répétition d'un échantillon de cuisse, deux puits à droite correspondant à la répétition d'un échantillon de bréchet, avec un disque au centre correspondant au

antibiotique témoin sensible. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé. (Figure 07). L'incubation des boîtes se fait à 37°C pendant 18-24 heures (Beliard, 1990).

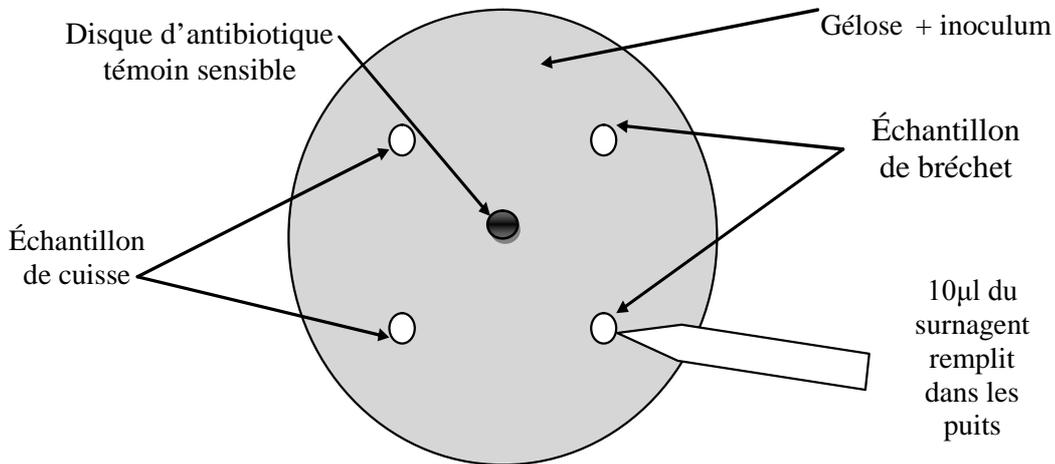


Figure 07: Recherche des résidus d'ATB par la méthode de puits.

II.2.2.3.B. Méthode des disques (papier de Whatman)

C'est la même méthode des puits mais dans ce cas à la place de ces derniers on imbibe le papier de Whatman 6mm de diamètre par l'exsudat des viandes préparé. Nous avons réalisé aussi deux répétitions pour chaque échantillon, donc dans une boîte de Pétri, deux disques du papier Whatman imprégné par l'exsudat à la gauche correspondant à la répétition d'un échantillon de cuisse, deux disques du papier Whatman imprégné par l'exsudat à la droite correspondant à la répétition d'un échantillon de bréchet, avec un disque au centre correspondant au antibiotique témoin sensible. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé. L'incubation des boîtes se fait à 37°C dans l'étuve pendant 18-24 heures (Beliard, 1990).

II.2.2.3.C. Méthode de dépôt

- Découper les échantillons de viande par un ciseau stérile en petits morceaux.
- Les mettre dans un pilon stérile pour l'écraser afin d'extraire le jus.
- À l'aide d'une pince stérile prendre une unité (8mm de diamètre et 2mm d'épaisseur) et placer dans la boîte de Pétri.
- Mettre les boîtes dans un réfrigérateur à 5°C pendant 2 heures.

- Incuber les boîtes à l'étuve pendant 24h à température 37°C.

➤ **Lecture des résultats**

L'action inhibitrice de la croissance bactérienne qui correspond à la présence de résidu d'antibiotique dans l'échantillon se traduit par la formation d'une zone d'inhibition (halos) quel que soit la méthode suivie (**Exsudat**: déposé dans des puits et des disques de papier de Whatman ; **Morceaux**: dépôt direct).

La mensuration est réalisée à l'aide d'une règle, Les échantillons de viande donnant des zones d'inhibition d'au moins de 8 mm et plus de diamètre sont considérés comme positifs, et ils sont considérés comme contenant des antibiotiques.

Chapitre III

Chapitre III

Résultats et discussion

III.I. Détection de *Clostridium sulfito-réducteur* (CSR)

La figure 08 montre que sur vingt-et-un échantillons de viande de poulet testés, douze échantillons ont été trouvés positifs avec un pourcentage de 57,15 %, neuf ont été trouvés négatifs avec un pourcentage de 45,85 %.

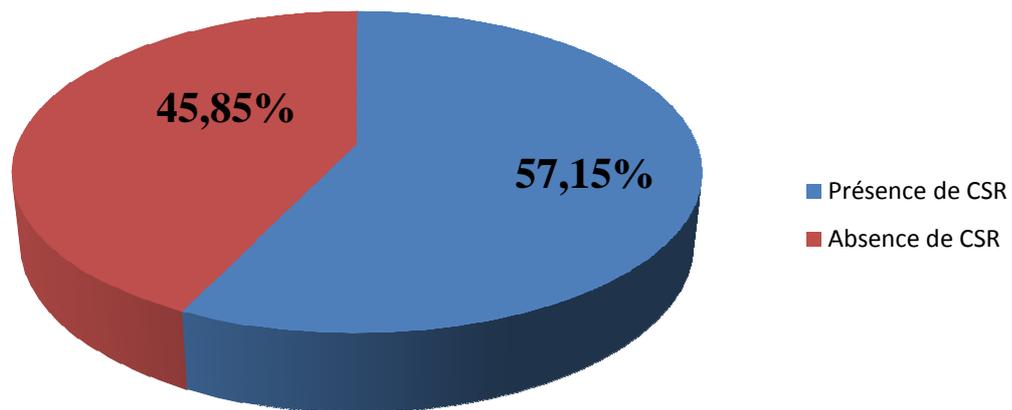


Figure 08: Prévalence de contamination de la viande de poulet par *Clostridium sulfiro-réducteur*.

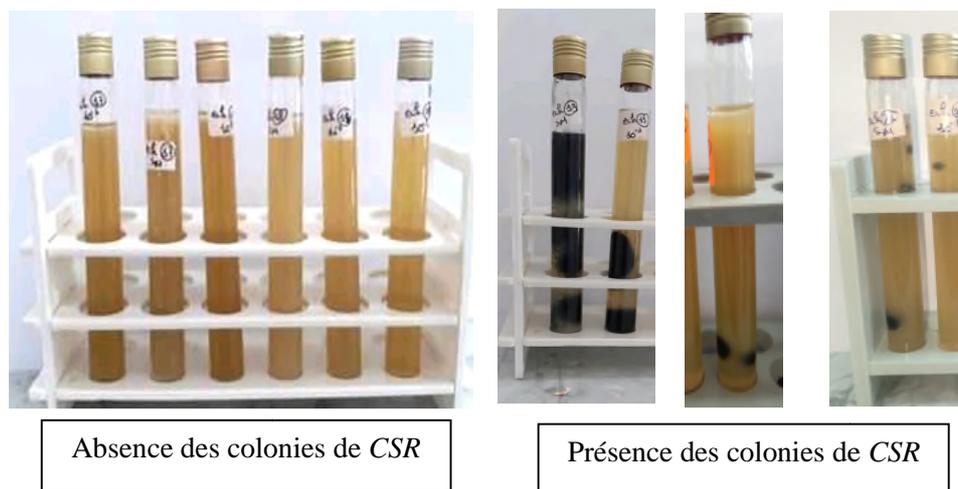


Figure 09: Absence/présence des colonies de *Clostridium sulfiro-réducteur* dans la viande de poulet.

Notre résultat concernant les *Clostridies sulfito-réducteur* a révélé une forte contamination de la viande, Cela peut être expliqué par l'éviscération qui n'est pas effectuée immédiatement et le contact des carcasses avec le contenu sale des viscères aussi les couteaux et les matériels utilisés qui ne sont pas désinfectés régulièrement.

Nana (2000) a indiqué que le personnel contamine les carcasses par l'intermédiaire des mains souillées et non nettoyées en manipulant plusieurs lots.

Roger et al. (2011) en **Texas** ont montré la présence de *Clostridium sulfito-réducteur* dans sept échantillons sur trente deux échantillons analysés avec un pourcentage de 7,3% ce qui est inférieur a nos constatations.

Afshari et al. (2015) en **Iran**, ont isolé *Clostridium perfringens* a partir de viande dans 200 échantillons ou 31 échantillons ont été positifs avec un pourcentage de 15,50% aussi **Razmyar et al., (2017)** ont isolé *Clostridium difficile* a partir de viande sur 65 échantillons emballés de poulet ou 10 échantillons étaient positifs avec un taux de 15,30%.

D'après **Jouve (1996)**, les *Clostridies* sont des bactéries anaérobies strictes témoin d'une contamination fécale ancienne et sont parfois présentes dans les élevages, les plumes et la peau de l'animal vivant ce qui contamine les carcasses à l'arrivée à l'abattoir.

L'absence de *Clostridium sulfito-réducteur* au niveau des autres échantillons témoigne sa salubrité, ce qui peut confirmer l'application des bonnes pratiques d'abattage et peut être due surtout à la bonne utilisation des antibiotiques et le respect des conditions d'hygiène et d'asepsie durant la période d'élevage.

III.II. Recherche des résidus d'antibiotiques

III.II.1. Résultats de vérification de la pureté des souches bactériennes utilisées

III.II.1.A. Caractéristiques macroscopiques

La première étape du diagnostic bactérien des souches peut être confirmée par la description macroscopique des colonies.

Les paramètres caractéristiques sont les suivants :

- **La pureté:** Elle se montre par la présence d'un seul type de colonie.
- **La viabilité:** C'est la capacité d'une bactérie à croître et à former une colonie visible sur la gélose nutritive, à l'exception des souches viables non cultivables.
- **L'aspect des colonies:** La taille, la forme, le relief, et le contour.
- **La pigmentation:** Correspond à la teinte de la colonie (Solbi, 2013).

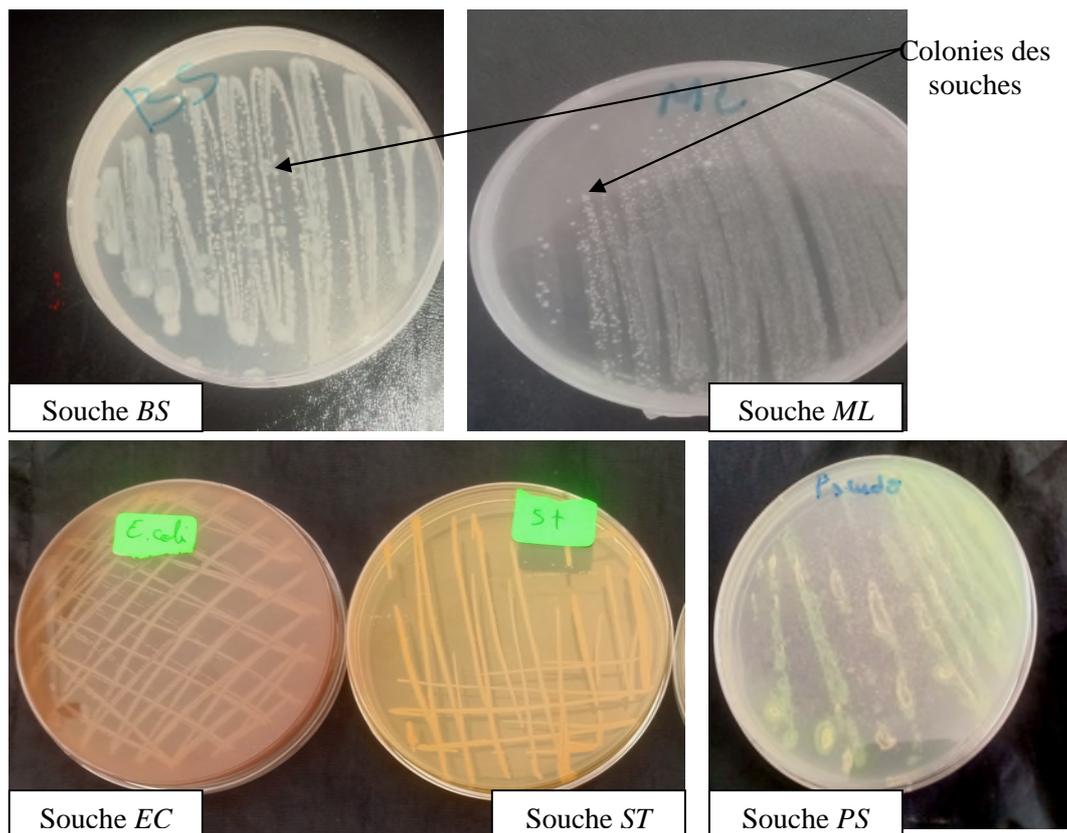
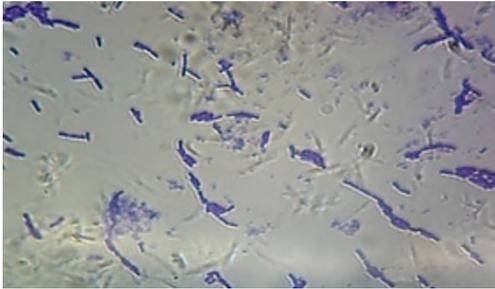
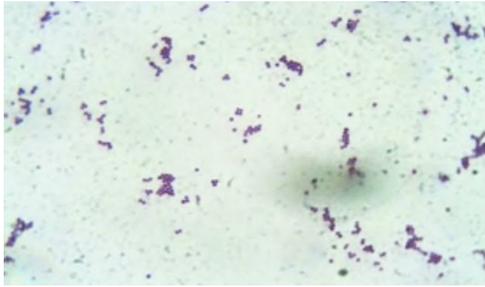
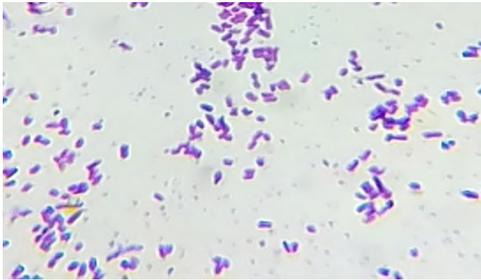


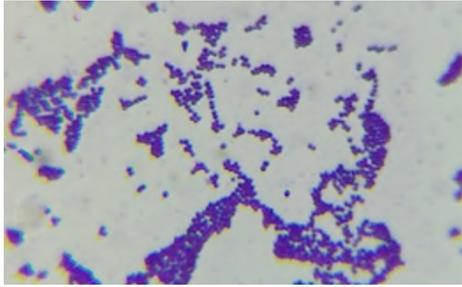
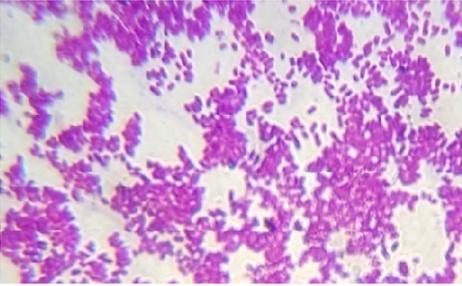
Figure 10: Aspect macroscopiques des souches utilisées.

III.II.1.B. Caractéristiques microscopiques

Après la coloration de Gram qui met en évidence l'affinité tinctoriale et l'observation sous le microscope nous avons obtenu les résultats qui sont mentionnés dans le tableau 04.

Tableau 04: Caractéristiques microscopiques des souches utilisées après coloration de Gram.

Souches	Description
 <p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>Bâtonnet, Gram +, Isolés, en paire, en chaînes.</p>
 <p><i>Micrococcus luteus</i></p>	<p>« Micrococcus » souvent groupées en tétrades ou en amas irréguliers.</p>
 <p><i>Escherichia coli</i></p>	<p>« Escherichia » c'est des coccobacilles Gram -.</p>

 <p style="text-align: center;"><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>« Staphylococque » groupé en amas irréguliers à la façon d’une grappe de raisin, apparaît à l’examen microscopique comme Cocci Gram + (Guiraud, 1998).</p>
 <p style="text-align: center;"><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Bâtonnet Renflé, Gram - Diplobacilles, en chaînes</p>

III.II.1.C. Caractéristiques biochimiques

Tableau 05: Résultats des tests biochimiques des souches; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* réalisés manuellement.

Souche			
Caractéristiques biochimiques	<i>EC</i>	<i>ST</i>	<i>PS</i>
Catalase	+	+	+
Oxydase	-	-	+

+ : présence ; - : absence

Après la réalisation des tests biochimiques par la galerie API 20^E et la lecture des résultats par le logiciel nous avons trouvé : *Escherichia coli* avec 52%, 72% pour *Staphylococcus aureus* et 68% pour *Pseudomonas aeruginosa* ce qui confirme la pureté de nos souches.

III.II.2. Résultats de détection les souches sensibles vis-à-vis certains antibiotiques (Témoin positif)

L'ensemencement des souches dans le milieu MH (**Annexe I**) en présence des disques d'antibiotique nous permet de classifies trois interprétations différentes :

- **Sensible** : Les souches S sont celles que nous avons choisis pour la réalisation de notre travail.
- **Résistante** : Les souches R sont celles qu'on ne peut pas utilisés pour cette expérimentation.
- **Intermédiaire** : Les souches I sont celles qui sont acceptable pour la réalisation de cette expérimentation.

Les résultats de sensibilités des souches sont présentés dans **la figure 11** et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et mentionnés dans **le tableau 0**

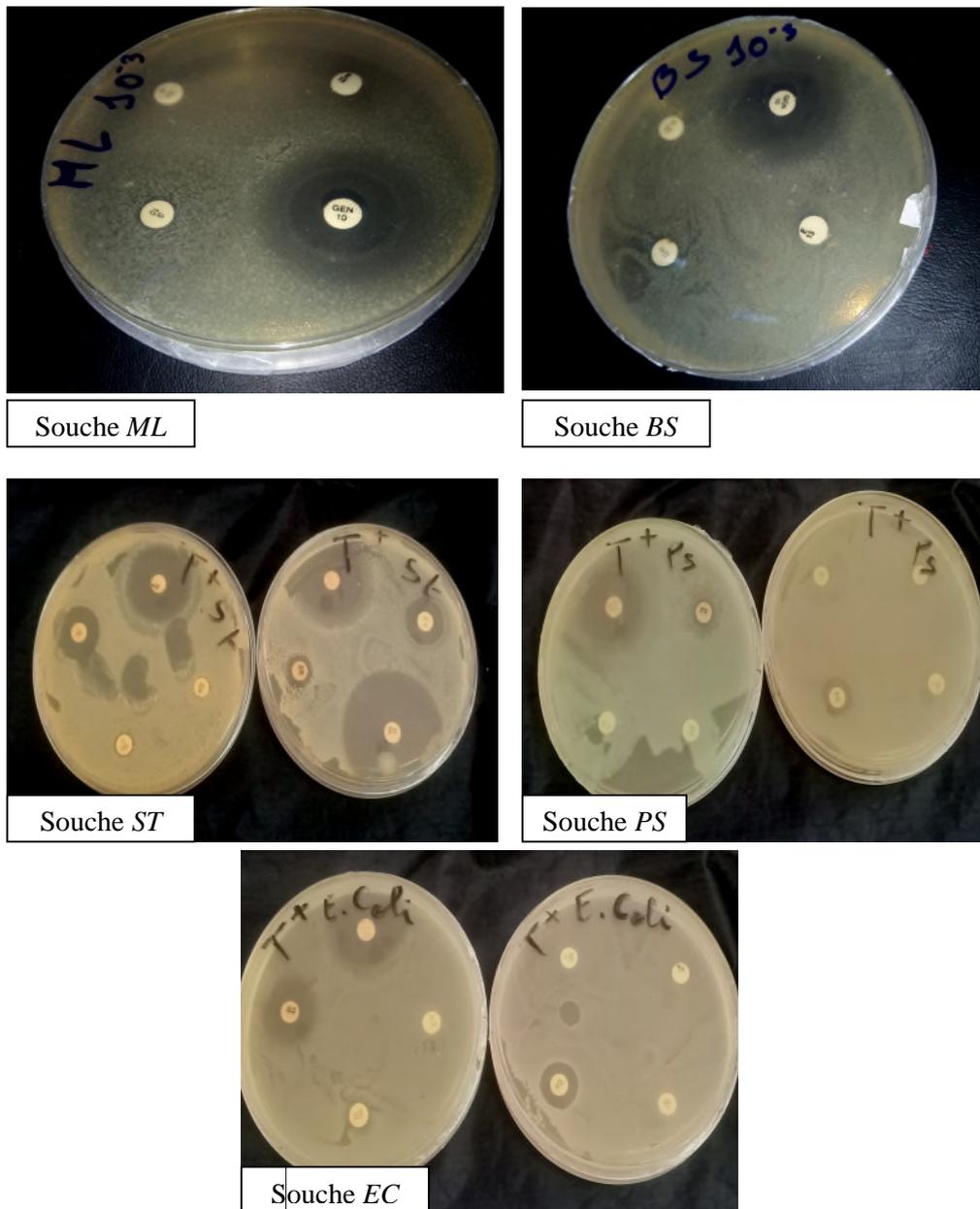


Figure 11: AntibioGramme de souches utilisées.

Tableau 06: diamètre des zones d'inhibition en mm des souches bactériennes utilisées.

Souche ATB	BS	ML	EC	ST	PS
S	00 mm	00 mm	10 mm	10 mm	10 mm
TE	05 mm	04 mm	6 mm	2 mm	3 mm
TIC	00 mm	03 mm	2 mm	17 mm	1 mm
P	00 mm	00 mm	00 mm	5 mm	00 mm
CN	6 mm	8 mm	/	/	/

CT	/	/	8 mm	00 mm	3 mm
OX	/	/	00 mm	7 mm	00 mm
MT	/	/	2 mm	00 mm	00 mm

On a pu attribuer aux cinq souches bactériennes testées des phénotypes d'antibiogrammes, qui sont mentionnées dans **le tableau 07**.

Tableau 07: Phénotypes d'antibiogramme des souches bactériennes testées.

Souche Phénotype d'antibiogramme	<i>BS</i>	<i>ML</i>	<i>EC</i>	<i>ST</i>	<i>PS</i>
Sensible	CN	CN	S, TE, CT	S, TIC, ERY,OX	S
Intermédiaire	TE	TE, TIC	TIC,MT	TE, P	TE, CT,
Résistante	S, TIC, P	S, P	P, ERY, OX	CT,MT	P, OX, MT

D'après **le tableau 07**, on peut constater que les deux souches *EC*, *ST* sont les souches les plus sensibles vis-à-vis des antibiotiques ou *Escherichia coli* était sensible aux : S, TE,CT et *Staphylococcus aureus* était sensible vis-à-vis des : S, TIC, CT, Ery, OX, de ce fait, nous avons choisi ces deux dernières pour les tests de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet.

III.II.3. Résultats des tests des échantillons (méthode de 4 boîtes)

Après l'analyse des échantillons de viande de poulet, les résultats obtenus montrent l'absence des zones d'inhibitions qui témoignent l'absence des résidus d'antibiotiques par les trois méthodes utilisées (puits, dépôts, des disques de Whatman) (**figure 12**).

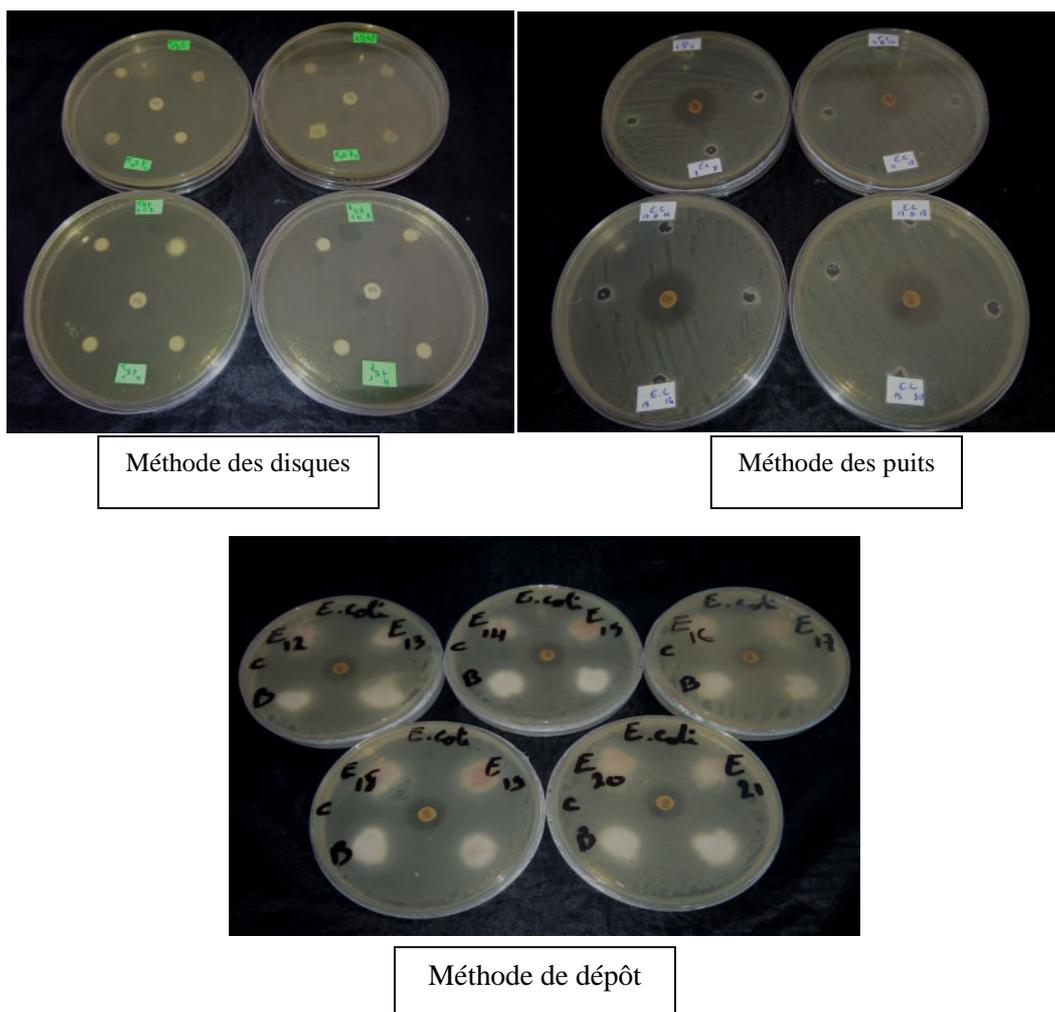


Figure 12: Résultats de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet.

Dans la présente recherche, nous avons trouvés que 100 % des échantillons ont été négatifs que ce soit pour les cuisses ou les bréchets de poulet analysés ce qui signifie probablement l'absence des résidus des substances à activité antimicrobienne dans ces échantillons, cela peut être expliqué par la présence de ces molécules avec des faibles concentrations et la voie de leur administration qui peuvent influencer sur leur distribution dans l'organisme surtout concernant l'utilisation de ces produits par voie orale.

Klotins (2006) a indiqué que l'usage d'antibiotiques à faible doses et pendant des périodes prolongées peut accélérer le gain de poids ou améliorer l'indice de conversion mais il faut savoir que l'importance de l'amélioration dépend de différents facteurs, dont la composition des aliments, les pratiques de gestion et l'état sanitaire du troupeau.

Une étude réalisée à **Tunisie** par **Ben Ali, (2007)** a montré une absence totale des résidus d'antibiotiques dans les échantillons analysés aussi à **M'sila** par **Ahmed et Ben Hamida, (2019)** ont signalé le même résultat dans les muscles de poulet ce qui est similaire à nos constats. Cela peut être justifié par la dégradation rapide des produits à activité antimicrobienne dans les muscles.

Aussi le nombre d'échantillons utilisés pourrait influencer ces résultats. En effet, dans notre étude et compte tenu de nos moyens limités, seulement 21 échantillons ont été analysés.

Au **Lebanon Adla et Nada, (2019)** ont signalé que 53% de 80 échantillons a été contaminé par les résidus des antibiotiques, **Baazize-Ammi et al., (2019)** en Algérie ont montré une contamination avec 32,39% et au Sénégal **Châtaigner et al., (2003)** et **Bada-Alamedji et al., (2004)** ont rapporté des taux de positivité de 3% et 9.8 % respectivement ce qui contraste nos résultats.

Ces pourcentages de positivité dans les autres études est peut être due au non-respect de délai d'attente, ainsi qu'à l'automédication des animaux par les éleveurs, chez lesquels les notions sur les conditions et les doses administrées sont absentes.

En effet, en comparant ces résultats avec nos investigations on peut noter une très grande différence qui pourrait s'expliquer essentiellement par :

La bonne gestion des élevages avicoles qui garantissent aux animaux un statut sanitaire de haut niveau et par conséquent une moindre utilisation des substances à activité antimicrobienne mais cela ne peut jamais confirmer l'absence totale de ces produits.

Conclusion

Conclusion :

La présente étude, nous a permis de faire une recherche de *clostridium sulfito-réducteur* et les résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet ou la présence de ces derniers peuvent poser des grands problèmes sur la santé publique et animale.

Les analyses bactériologiques effectuées, ont révélé une contamination importante au niveau des échantillons avec un taux de 57,14% par les *clostridium sulfito-réducteur* ce qui est expliqué généralement par le non respect au conditionnement d'asepsie que ce soit pour l'abattage, la manipulation et la conservation des viandes de poulet.

Quant à la recherche des résidus d'antibiotiques avec la méthode officielle de quatre boîtes, les résultats ont montré qu'il n'y a aucune présence de ces produits dans tous les échantillons analysés mais cela ne confirme pas leur absence totale.

La viande de poulet a connu une grande consommation surtout dans ces dernières années donc il est impératif de veiller à la bonne qualité, tant sur le plan hygiène médicamenteuse que sur le plan microbiologique.

Recommandations

- ✓ Une sensibilisation des éleveurs et des abatteurs à travers des formations pourrait permettre à ces derniers d'avoir une meilleure technique d'élevage, et de manipulation des viandes.
 - ✓ Le respect des conditions d'hygiène et de désinfection dans l'abattoir surtout après d'éviscération et de ressuage.
 - ✓ Mise en place de moyen de lutte contre les contaminations croisées au moment de la filière avicole; notamment dans les élevages, les couvoirs et le transport
 - ✓ Le respect de la dose et le délai d'attente après l'administration des médicaments et surtout les antibiotiques est très important et nécessite la conscience de l'éleveur et la responsabilité des vétérinaires étatiques ou privés.
 - ✓ La bonne cuisson des viandes après leur achat par les consommateurs pour assurer la destruction des germes.
-

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adla J et Nada E D, 2019:** Evaluation of Antibiotics Residues in Chicken Meat Samples in Lebanon.
 2. **AFNOR, 2006:** Rapport d'étude préliminaire pour la validation AFNOR du Premi®Test. Code d'étude : VV.
 3. **AFNOR, 2011:** Rapport de synthèse de l'étude de validation du Premi® Test (r-biopharma) est de détection des résidus d'antibiotique dans le musclepage.
 4. **Afshari et al, 2015:** Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from broiler meat in northeastern of Iran.
 5. **AFSSA, 2003:** Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique France.
 6. **AFSSA, 2006:** Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, Agence Française de sécurité sanitaire des aliments, p: 46-49.
 7. **Ahmed F Z et Ben Hamida H, 2019:** Détection des résidus d'antibiotiques dans la viande du poulet de chair dans la région de M'sila, Mémoire de Master Académique en nutrition et sciences des aliments.
 8. **Andermont A, 2000 ;** Impact des antibiotiques sur l'écologie de la résistance bactérienne : Rôle de tube digestif, (30),p :178-184.
 9. **Azzizi D, 1998 :** Microbiologie alimentaire -norme NF V08-0022 : Directives générales pour les examens microbiologique.
 10. **Bada-Alamedji R., Cardinal E., Biagui C. et Akakpo A.J, 2004:** Recherche de résidus de substances à activité antibactérienne dans la chair de poulet consommée dans la région de Dakar (Sénégal). École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV). Service de Microbiologie Immunologie, Pathologie Infectieuse, p: 4.
 11. **Beliard E ,1990:** Sélection des souches de bactéries lactiques inhibitrices de contaminations des viandes et études des mécanismes d'inhibitions. Application à la conservation des produits carnés. Thèse de Doctorat en sciences alimentaires.
-

12. **Ben Ali, 2007:** Détection de Résidus d'antibiotiques dans les aliments par une méthode microbiologique, Mémoire de fin d'étude, Microbiologie Industrielle, Université de la MANOUBA, Institut Supérieur De Biotechnologie de Sidi Thabet, Tunisie, p: 36.
 13. **Bergey's Manuel, 2014:** systématique Bactériologie de Bergey.
 14. **Boukhalfa L, 2006:** L'aviculture en Algérie. Journée sur la grippe aviaire. Batna. Algérie. Les 15 et 16 mars 2006.
 15. **Brook I, 2009:** the role of anaerobic bacteria in bacteremia. Anaerobe.
 16. **Brouillet P, 2002:** Résidus de médicaments dans le lait et tests de détection. Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires, (15): 171.
 17. **Cerniglia C E, Kotarski S, 2005:** Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics, p: 3-20.
 18. **Chougui N, 2015 :** Technologie et qualité des viandes, Mémoire de Master académique ; université Abed El Rahmane Mira de Bejaia, p: 39.
 19. **Delarras C, 2007:** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Paris : Lavoisier : Tec et Doc.
 20. **Delarras, 2014 :** Camille 2014 : Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures et moisissures .p: 199-231.
 21. **Delpine B, Hurtaud-pesseld et Sanders P, 2002:** Les méthodes récentes d'analyse physico-chimiques des résidus d'antibiotiques dans le lait, Bulletin des groupements techniques Vétérinaires, 15, p: 191-196.
 22. **Démoré B, Grare M, Duval R ; 2012:** Pharmacie clinique et thérapeutique 4ème édition ; Chapitre 40: Généralité sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation .Elsevier Masson.
 23. **Elgroud R, 2009:** Contaminations du poulet de chair par les salmonelles non typhiques en élevages et abattoirs de la wilaya de Constantine.
 24. **Fabre et al. 2004, Fabre J-M. Petit C .et Bosquet G, 2006:** Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, édition 2006, p: 4.
 25. **FAO , 2016:** Consommation de viande en 2014.
-

26. **Gaudin V, Fabre J M et Rault A , 2006:** Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse- application à la détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires. Laboratoire d'étude et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. FOUGERES. France, p: 86.
 27. **Guiraud J. P, 1998:** Microbiologie alimentaire, Ed, DUNOD, Paris, p: 133-138-540-541-549-568-573-581-598.
 28. **Hakem A, Titouche Y, Houali K, Yabrir B, 2013:** Screening of Antibiotics Residues in Poultry Meat by Microbiological Methods. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine, p: 77-82.
 29. **Hoyt et al., 1938, Hoyt A, Chaney A L et Cavell K, 1938:** Studies on Steam Sterilisation and the effects of Air in the Autoclave. Journal of bacteriology, 36(6), p: 639-652.
 30. **Joe-Berry G.et Delbert W, 2008:** Bacterial diseases of poultry. Division of agricultural science and naturalre sources. Oktlahoma state university cooperative extension fast sheets (VTMD-9190). Consulter le (01-04-2012).
 31. **Johnson, E.A.Summanen, P and Finegold, S. M , 2007:**Clostridium. In P.R.Murray (ed.), Manual of clinical Micobiology.Washington, D.C.: ASM Press.p:889-910.
 32. **Jouve J.L .1996 :** Volaille et ovo produits in « la qualité microbiologique des aliments :maitrise et critères ». Ed. polytechnica, paris.
 33. **Kanati Y.T, 2011:** détection des résidus d'antibiotique dans les viandes de bovins prélevé aux abattoirs de Dakar. Mémoire de master qualité des aliments de l'homme, spécialité : produit d'origine animale, école Inter-états des Sciences et médecine Vétérinaires (EISMV), Dakar ,p.p.1-15.
 34. **Klotins K, 2006:** Utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance, controverse et solutions.
 35. **Laurentie M. et Sanders P, 2002:** Résidus de médicament vétérinaires et temps d'attente dans le lait. Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires. p: 197-201.
 36. **Lee M.H., Lee H.J., Ryo P.D 2000:** Public health risks:chemical and antibiotic residues.Review.Asian Australian Journal of Animal sciences ,(14):403.
-

37. **Maillard R, 2002 :** Antibiothérapie respiratoire La Dépêche Vétérinaire, p: 15-1.
 38. **Mary A, 1998:** Convention 2471/2 entre la Région wallonne et la Faculté. Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux - Unité de Technologie des Industries Agro-alimentaires, p : 63.
 39. **Nana G S, 2000:** Les points à risque de la contamination microbiologique de la viande de poulet de chair dans la région de Dakar. Thèse de sciences vétérinaires, université Cheikh Anta Diop, Dakar.
 40. **Ndiaye. M-L, 2002:** Contribution à l'étude de la contamination microbiologique de la viande de volailles, page 2-4.Mémoire de DEUA, Faculté des sciences et techniques institut de technologie nucléaire appliquée I.T.N.A. Université CHEIKH Anta Diop de Dakar.
 41. **Nicha R, 2008:** Antibiotic residues. A global health hazard. Vet. World, 1(12); p: 375-377.
 42. **OIE, 2010:** Code sanitaire pour les animaux terrestres, Volume I. Dix-neuvième édition. ISBN978-95-9044-7726.Copyright OMSA. p: 25.
 43. **OMS, 2005:** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine, 4^{ème} édition. p: 94.
 44. **Ouderdouk A B, and Garrett W S, 2009:** Gas Gangrene and other clostridium-Associated Diseases.In G. L.Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practices of Infectious Diseases, 7th Edition ed, New York: Churchill Livingston.
 45. **Popelka P., nagy j.R., Germuska R., Marcincak S., Jevinova P. et DE RIJK A, 2005:** Comparison of various assays used for detection of beta-lactam antibiotics in poultry meat. Food Additives and Contaminants.
 46. **Popoff, M.R., and Bouvet, P. 2009:** Clostridial toxins. Future microbiology,4 , 1021-1064.doi :10.2217/fmb.09.72.
 47. **Poxton I R , 2006:** Other Clostridium spp.In S.H.Gillespie,et P.M. Hawke (Eds) ,Principles and Practice of clinical Bacteriology(2nd ed.,pp.567-574).West Sussex:John Wiley&Sons,Ltd.
 48. **Razmyar J, Jamshidi A, Khanzadi, S and Kalidari Gh, 2017:** Toxigenic *Clostridium difficile* in retail packed chicken meat and broiler flocks in northeastern Iran.
-

49. **Roger B, Keri N, Kathleen A, 2011:** Clostridium difficile in Poultry and Poultry Meat.
 50. **Rogister G.M, 2000 :** Hormones, substances anabolisantes et résidus de traitement vétérinaires en relation avec la sécurité alimentaire. Ed.TEC and DOC, Lavoisier, Paris, p : 184-185.
 51. **Russel A D, 2001:** Chemical Sporocidal and sporostatic Agents.In S.S.Block (Ed), Desinfection, Sterilisation and Preservation (5th ed.,pp. 529-541). Philadelphia PA: Lippincott Williams and Wilkins.
 52. **Rutala W A, 1996:** APIC guideline for selection and use of disinfectants.AmericanJournal of Infection control, 24(4),p: 313-342.
 53. **Ryan J R, 2004:** Clostridium, Peptostreptococcus, Bactéroïds, and other Anaerobes. In K J Ryan end C G Ryan(Eds) Sherris Medical Microbiology : An Introduction to Infectious diseases ,4th ed.p: 3-9-326.
 54. **Sauveur B, 1997:** Les critères et les facteurs. Ed. INRA Prod. Anim., 10(3), p: 1-8.
 55. **Schneierson S S, 1972:** Sterilisation byheat.International Anesthesiology Clinics, 10(2), p: 67-83.
 56. **Solbi S, 2013:** Effet du repiquage de *Pseudomonas Aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques,p: 45.
 57. **Spelman D, 2011:** Toxic Shock syndrome due to Clostridium sordellii.www.uptodate.com.
 58. **Stoltz R, (2008):** Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : Evaluation et maitrise de ce danger .thèse de doctorat. Université Claud Bernard-Lyon I (France). p: 9-152.
 59. **Toldra F et Reig, 2008:** Veterinary drugs residues on meat: concerns and rapid methods for detection-meat sciences, (78), p: 60-67.
 60. **Zanditans M, 1999 :** L'usage des antibiotiques par les vétérinaires praticiens : enjeu sanitaire et socio- économique, conséquences pour la santé publique et évolution prévisible de la profession vétérinaire Thèse de Doctorat vétérinaire, Créteil, 1999, n°88, p: 124.
-

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture (Guiraud, 1998).

Milieu	Composition (g/l)
Viande-foie pH=7,4, Autoclaver 15 min à 120°C.	Extrait viande-foie.....10g Peptone20g Extrait de levure.....10g Glucose..... 5g Gélose..... 15g
Chapman pH=7,4, Autoclaver 20 min à 115°C.	Peptone.....10g Extrait de viande.....6g Protéose peptone.....10g Chlorure de sodium.....150g Lactose.....15g Gélose.....1g
Mac Conkey pH = 7.1, Autoclaver 15 min à 120°C.	Peptone.....20g Lactose.....10g Sels biliaires n°3.....1,5g Chlorure de sodium.....5g Rouge neutre.....0,05g Cristal violet.....0,001g Agar.....15g
Mueller-Hinton pH = 7.4, Autoclaver 15 min à 115°C.	Extrait de viande.....2 g Hydrolysate acide de caséine.....17,5 g Amidon.....1,5 g Gélose.....10 g
Cétrimide pH = 7,2, Autoclaver 15 min à 120°C.	Peptone20 g Sulfate de potassium.....10 g Chlorure de magnésium.....3 g Glycérol.....10 ml Phosphate dipotassique0,3 g Cétrimide0,2 g Acide nalidixique (facultatif selon les formules).....15 mg Gélose13g
GN pH =6,8 ; Autoclaver 15 min à 115°C.	Protéose-peptone.....10 g Infusion de cervelle de veau.....12,5 g Infusion de cœur de bœuf.....5 g Chlorure de sodium.....5 g Phosphate disodique.....2,5 g Glucose.....2 g

➤ **Solution Ringer**

C'est solution physiologique Pour 1 litre composée de 9 g chlorure de sodium, de 0,42 g potassium, de 0,48 g chlorure calcium et de 0,2 g Bicarbonate de sodium.

Autoclaver 15 min à 120°C, ce milieu est fréquemment utilisé dilué au ¼.

➤ **Eau physiologique**

L'eau physiologique est un diluant isotonique utilisé pour les dilutions ou la réalisation de suspensions bactériennes.

Composition : Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée

Chlorure de sodium : 8,50.

➤ **TSE (L'eau physiologique peptone)**

Tryptone.....	1g/l
Chlorure de sodium.....	8.5g/l

Annexe II

1-Technique Coloration de Gram (Delarras, 2007)

Elle permet l'identification de la paroi des bactéries, nous avons deux grandes catégories :

- **Les bactéries Gram+** : la paroi est riche en muérine et en magnésium qui donne une couleur violette.
- **Les bactéries Gram -** : la paroi est riche en lipides qui donnent une couleur rose.

Technique

- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane pendant une minute.
- Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol pendant une minute.
- Faire décolorer la lame inclinée par l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte soit non colorée.
- Rincer par l'eau distillée.
- Recolorer avec la fuschine et laisser pendant 10 à 20 secondes.
- Rincer par l'eau distillée une deuxième fois.
- Sécher en chaleur.
- Observation au microscope optique à l'objectif $\times 100$ à l'immersion.

Résultats :

- **Les bactéries Gram +** : gardent la coloration violette après décoloration par l'alcool.
- **Les bactéries Gram -** : décolorent par l'alcool, sont teintées par la fuschine et apparaissent rose ou rouge.

2-Teste biochimique galerie API 20^E

Principe

Le système API 20^E BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

3- Standard MC Farland

Les solutions standards MC Farland sont utilisées pour la standardisation des épreuves de sensibilité aux antibiotiques. La solution de base, soit le standard 0,5 MC Farland, contient approximativement de 1×10^7 à 1×10^8 colonies par ml (1×10^{10} à 1×10^{11} colonies par litres).

Précautions

Ce milieu est pour usage exclusif au laboratoire.

Conservation

Garder la solution standard à l'abri de la lumière, entre 2-30°C

Détérioration

Rejeter une solution standard présentant des signes de contamination ou de détérioration. Ne pas utiliser une solution standard après trois mois de la date de production.

Technique

Agiter vigoureusement cette solution standard sur mélangeur vortex tout juste avant l'utilisation.

- Ensemencer un bouillon avec 4-5 colonies semblables d'une culture de 24 heures. Bien mélanger.
 - Incuber à 35°C pendant 2- 6 heures jusqu'à l'obtention d'une turbidité similaire à la solution standard requise. S'il faut diluer le bouillon ajouter de la saline ou du bouillon.
 - Pour les épreuves de sensibilité aux antibiotiques, ensemencer les surfaces des milieux de culture appropriés suivant les techniques standard déjà établies.
-

- Pour la vérification des qualités nutritives des milieux de culture, diluer les suspensions bactériennes suivant les standards déjà établis.

4- Principe de la méthode spectrophotométrique

Une culture bactérienne se comporte comme une suspension colloïdale absorbant et réfléchissant la lumière qui la traverse. Dans certaines limites la lumière absorbée ou réfléchi par la suspension bactérienne peut être directement proportionnelle à la concentration des cellules bactériennes dans la culture à une longueur d'onde donnée. Ainsi en mesurant l'intensité du rayon réfléchi ou le pourcentage de la lumière absorbée par une suspension bactérienne, on peut estimer le nombre de cellules présentes dans un milieu. Un spectrophotomètre exprime le plus souvent ces valeurs sous forme de densité optique (DO) définie par la loi de Beer Lambert, telle que

$$DO = \log I_0/I = \log 1/T$$

Ou :

I₀ : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière transmise.

T : la transmittance.

5-Antibiogramme

L'antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci, pour réaliser un antibiogramme il faut :

Des disques antibiotiques

Gélose Mueller Hinton

Des écouvillons stériles

Etuve

Annexe III

1-Matériels de laboratoire



Centrifugeuse



Vortex



Incubateur



Spectrophotomètre

2-Résultats de testes biochimiques des *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Souche Caractéristiques biochimiques	<i>EC</i>	<i>ST</i>	<i>PS</i>
ONPG	+	-	+
ADH	+	+	+
LDC	+	+	+
ODC	+	-	+
CIT	+	+	+
H ₂ S	-	-	+
URE	-	+	-
TDA	+	+	+
IND	+	-	+
VP	-	+	-
GEL	+	+	+
GLU	+	+	+
MAN	+	+	-
INO	+	+	+
SDR	+	+	-
RHA	+	+	-
SAC	+	+	+
MEL	+	+	+
AMY	+	+	+
ARA	+	+	+
CODE	7366773	6276773	7766267
%	52%	72%	68%

+ : présence ; - : absence

Résumé

Dans cette étude, nous avons analysée vingt-et-un échantillons de viande de poulet, dans le but de détecter la *Clostridium sulfito-réducteur* et d'autre part la recherche des résidus d'antibiotiques dans les parties de viande de poulet (cuisse, bréchet) par la méthode microbiologique officielle de quatre boites. Cette analyse est basée sur la mesurassions des zones d'inhibition et la diffusion de l'exsudat de viande des échantillons sur gélose (la méthode des disques, des puits et méthode de dépôt direct) en utilisant deux souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Nous résultat montrent que 57,15% de ces échantillons ont été contaminées par *Clostridium sulfito-réducteur* et l'absence totale des résidus d'antibiotique.

Mots clés : Viande de poulet, *Clostridium sulfito-réducteur*, résidus d'antibiotique, détection, zone d'inhibition, souche bactérienne.

المخلص

في هذه الدراسة ، قمنا بتحليل إحدى وعشرين عينة من لحوم الدجاج ، من أجل الكشف عن كلوستريديوم المختزل للكبريتيت ومن ناحية أخرى البحث عن بقايا المضادات الحيوية في أجزاء لحم الدجاج (الفخذ ، الصدر) بالطريقة الميكروبيولوجية الرسمية أربعة أطباق. يعتمد هذا التحليل على قياسات لمناطق التثبيط والإنتشار لإفرازات لحم العينات على أجار (طريقة الأقراص والآبار وطريقة الترسيب المباشر) باستخدام سلالتين من البكتيريا: الإشريكية القولونية *Escherichia coli* ، المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*.

أظهرت نتائجنا أن 57.15% من هذه العينات كانت ملوثة بعامل اختزال كلوستريديوم المختزل للكبريتيت والغياب التام لبقايا المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: لحم الدجاج ، المطثيات المقلصة للكبريتيت ، بقايا المضادات الحيوية ، الكشف ، منطقة التثبيط ، السلالة البكتيرية