

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
I- PREMIERE PARTIE : RAPPELS	3
I-1- Généralité sur les bactéries commensales	3
I-2- Généralité sur les amphibiens	3
I-2-1- Origine et évolution	3
I-2-2- Classification	5
I-2-3- Particularité anatomique.....	7
I-2-4- Dimorphisme sexuel	9
I-2-5- Cycle biologique	11
I-2-6- Famille Mantellidae	11
I-3- Généralité sur la Chytridiomycose et la Probiotique	13
I-3-1- Chytridiomycose.....	13
I-3-2- Probiotique et bioaugmentation.....	15
II- DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS.....	17
II-1- METHODES	17
II-1-1- Caractéristiques du site d'étude.....	17
II-1-2- Type d'étude.....	20
II-1-3- Période étudiée	20
II-1-4- Population étudiée	20
II-1-5- Critère d'inclusion et d'exclusion	20
II-1-6- Modes d'échantillonnage	20
II-1-7- Variables étudiées.....	20
II-1-8- Modes de collecte des données	22
II-1-9- Calculs, tests statistiques utilisées, conditions d'application.....	25
II-1-10- Limite de l'étude.....	27
II-1-11- Considérations éthiques	27
II-2- RESULTATS.....	28
II-2-1- Population explorée	28

II-2-2- Description des échantillons	29
II-2-3- Etude des bactéries	33
II-2-4- Pouvoir d'inhibition sur les Chytrides	34
II-2-5- Inhibition du Chytride chez les deux espèces	38
II-2-6- Bactéries inhibitrices du Chytride chez <i>B.m</i>	39
II-2-7- Bactéries inhibitrices du Chytride Chez <i>M. b.</i>	40
II-2-8- Analyse des facteurs influençant l'inhibition du Chytride	41
III- TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.....	45
CONCLUSION	48
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
WEBOGRAPHIES	
ANNEXES	

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I: Caractéristique géographique du site	18
Tableau II : Variables décrivant l'amphibien	21
Tableau III: Variables décrivant leur environnement	21
Tableau IV: Variables décrivant la famille de bactérie trouvée	22
Tableau V : Répartition des amphibiens	28
Tableau VI: Répartition de la population selon leur sexe	31
Tableau VII : Répartition de la population selon leur âge	31
Tableau VIII: Genre de bactérie inhibitrice du Chytride chez <i>B.m</i>	39
Tableau IX: Répartition des bactéries inhibitrices chez <i>M.b</i>	40
Tableau X : Sélection univariée des variables selon le lieu d'étude	41
Tableau XI : Sélection univariée des variables selon le poids	42
Tableau XII: Sélection univariée des variables selon le SVL	42
Tableau XIII: Sélection univariée selon l'âge des amphibiens	43
Tableau XIV : Sélection univariée selon le sexe	43
Tableau XV: Facteurs influençant l'inhibition le <i>Bd</i>	44

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Photo d'un <i>lissamphibien</i>	4
Figure 2 : Photo d'un anoure.	5
Figure 3: Photo d'un urodèle	6
Figure 4: Photo d'un gymnophione.	7
Figure 5: Photo d'un tégument.....	9
Figure 6: Photo d'un mâle (gauche) et une femelle (droite) <i>B.m.</i>	9
Figure 7: Photo d'un mâle et d'une femelle <i>Mantidactylus betsileanus</i>	10
Figure 8: Schéma du cycle biologique des amphibiens.	11
Figure 9: Photo de la partie dorsale du <i>Boophis madagascariensis</i>	12
Figure 10 : Photo de la partie ventrale du <i>Mantidactylus betsileanus</i>	13
Figure 11: Photo des <i>Rana Mucosa</i> mortes à cause du <i>Bd</i>	14
Figure 12: Photo d'un bain donné aux grenouilles au Sierra Nevada	15
Figure 13: Photo d'une zone d'inhibition.	16
Figure 14 : Site d'étude.....	19
Figure 15: Photo de la technique du prélèvement cutané.	23
Figure 16: Photo de la culture des bactéries.....	24
Figure 17: Photo de l'isolation des bactéries	25
Figure 18 : Photo d'un mâle <i>Boophis madagascariensis</i>	29
Figure 19: Photo montrant un <i>Mantidactylus betsileanus</i>	30
Figure 20: Répartition du SVL de l'ensemble des amphibiens	32
Figure 21: Bactéries inhibitrices ou non par rapport à tous les bactéries	34
Figure 22: Bactéries inhibitrices du Chytride par rapport <i>B.m.</i>	35
Figure 23: Inhibition ou non du Chytride chez <i>M.b</i>	36
Figure 24: Bactéries inhibitrices ou non du Chytride par rapport <i>M.b</i>	37
Figure 25: Proportion d'inhibition du Chytride chez les deux espèces.....	38

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Questionnaire sur l'identité, les caractères généraux de chaque individu, leur habitat

Annexe 2 : Méthode swabbing

Annexe 3 : Note et protocole

Annexe 4 : Répartition du genre de bactéries identifiées chez *Boophis madagascariensis*

Annexe 5 : Répartition des espèces de bactérie trouvées sur *Boophis madagascariensis*

Annexe 6: Répartition des genres de bactéries trouvées sur *Mantidactylus betsileanus*.

Annexe 7 : Répartition des espèces de bactéries chez *Mantidactylus betsileanus*.

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

<i>Bd</i>	:	<i>Batrachochytridium dendrobatidis</i>
<i>B.m</i>	:	<i>Boophis madagascariensis</i>
ADN	:	Acide Désoxyribonucléase
IC	:	Intervalle de Confiance
<i>M.b</i>	:	<i>Mantidactylus betsileanus</i>
nb	:	Nombre
p	:	p- value
PCR	:	Polymérase Chain Reaction
sp	:	species
SVL	:	Snout-Vent-Lenght (mesure de la tête- corps)
UICN	:	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
USA	:	United States of America (Etats- Unis d'Amérique)

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Six mille cinq cents espèces d'amphibiens sont documentées dans le monde, 99% ont été évaluées soit 6260 espèces (Jean-Christophe, 2008). Parmi elles, on estime qu'environ le tiers est menacé d'extinction. L'Amérique du Sud et l'Ouest de l'Afrique sont les deux régions hotspots de la biodiversité mondiale des amphibiens [1]. Madagascar est aussi un pays à megadiversité et hotspot [2].

Actuellement, les amphibiens traversent une crise. Ils sont parmi les vertébrés les plus menacés d'extinction dans le monde. Les menaces sont multiples [3]: la destruction de leur habitat, la surexploitation, le changement climatique, la pollution, l'utilisation des produits tels que les pesticides, la consommation humaine, la maladie infectieuse [4]. A part tous ces enjeux, l'apparition de la nouvelle maladie de la peau qui s'appelle Chytridiomycose, dont l'agent pathogène est *Batrachochytridium dendrobatidis*, est l'un des facteurs de leur déclin [3]. À ce jour, il a été détecté sur 387 espèces dans 45 pays [5]. Une étude menée depuis 2005 a montré que les amphibiens à Madagascar sont sensibles à cette maladie [4].

Aucune médication efficace n'arrive à lutter contre cette maladie qui décime la population entière. Parmi les solutions ailleurs, la lutte biologique naturelle utilisant des bactéries commensales de la peau, menée par des chercheurs (Vredenburg et al. 2011) sur *Rana muscosa* au Sierra Nevada, a montré que certaines bactéries isolées à partir de la peau d'un amphibien peuvent inhiber la maladie létale causée par *Batrachochytridium dendrobatidis* [3- 6].

La question qui se pose est de savoir si les bactéries trouvées sur la peau des deux espèces de grenouille étudiées (*Boophis madagascariensis* et *Mantidactylus betsilelanus*) peuvent inhiber la pullulation et tuer l'agent pathogène de *Batrachochytridium dendrobatidis*.

Aucune étude ne semble avoir été menée, à Madagascar, sur l'identification des bactéries prélevées sur la peau des amphibiens. La réalisation de cette étude apportera une connaissance sur la famille des bactéries cutanées des amphibiens et sur les bactéries qui peuvent tuer l'agent pathogène ou inhiber la croissance de *Bd* [7]. Elle permet aussi d'obtenir une médication de traitements d'attaque en cas de maladie.

L'objectif général de cette étude est de caractériser la population de grenouille hébergeant des bactéries inhibitrices du Chytride.

L'hypothèse est :

- Les bactéries sur la peau des amphibiens sont spécifiques. Elles agissent seulement et positivement sur une hôte ou plusieurs populations de même hôte.

Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs spécifiques consistent à effectuer une collecte de données sur les espèces de grenouilles et les bactéries puis une analyse factorielle sur le facteur favorisant le pouvoir inhibiteur du Chytride.

I- PREMIERE PARTIE : RAPPELS

I-1- Généralité sur les bactéries commensales

Ce sont des bactéries qui vivent au contact du revêtement cutané et muqueux de l'hôte sans entraîner des désordres. Ces bactéries proviennent soit de l'environnement soit d'autres hôtes.

Dès la naissance, une flore bactérienne s'installe déjà au niveau de la peau et les muqueuses et durera tout au long de la vie. La flore varie en fonction de différents éléments (alimentation, âge, état de santé) [8]. Elle constitue une barrière écologique contre l'implantation des germes virulents.

I-2- Généralité sur les amphibiens

I-2-1- Origine et évolution

Le mot Amphibien signifie : double vie (*amphi* : double ; *bios* : vie)

Les Amphibiens sont les tétrapodes les plus primitifs ayant des pattes. Ils sont les témoins d'un événement majeur dans l'histoire des vertébrés. Leur développement passe par un stade larvaire aquatique, puis une métamorphose permettant à l'adulte de respirer à l'air libre et de se déplacer sur terre. [9-12]

Les classes des Lissamphibiens [figure 1] sont les représentants actuels des amphibiens. Ils sont de petite taille, ectotherme (la température du corps dépend de la température du milieu environnant), pourvus de deux paires de membres, des poumons, et une peau dépourvue d'écailles. [13]



Figure 1 : Photo d'un *lissamphibien*.

Source : RABIBISOA Nirhy.

I-2-2- Classification

Celle-ci se divise en trois ordres : [14]

- les anoures, majoritaires et sans queue, composés notamment de grenouille et de crapaud (la queue régresse après la métamorphose jusqu'à disparaître complètement) [figure n°2].



Figure 2 : Photo d'un anoure.

Source : RABIBISOA Nirhy.

- les urodèles gardent leur queue telles les salamandres et les tritons. Ils n'existent pas à Madagascar. [figure n°3].



Figure 3: Photo d'un urodèle

Source : Encyclopédie Larousse en ligne ; consultable sur www.larousse.fr

- les gymnophiones, apodes ou cécilies. Les pattes sont atrophiées. [15]

Ils sont absents à Madagascar. [Figure n °4]



Figure 4: Photo d'un gymnophione.

Source : JIBHAINE.

I-2-3- Particularité anatomique

I-2-3-1- Membres

Ils possèdent quatre pattes :

Les membres postérieurs portent 5 doigts.

Les membres antérieurs portent 4 doigts [16].

I-2-3-2- Squelette

Il est dépourvu de sternum et les côtes ne constituent pas la cage thoracique.

Les appareils digestifs, génitaux et urinaires se rejoignent dans un seul orifice : le cloaque.

I-2-3-3- Peau

Elle est nue, lisse, visqueuse, fine et humide en permanence. Elle contribue à la respiration grâce aux échanges gazeux qui s'effectuent sur toute sa surface. [17] [figure n°5].

- L'épiderme :

Il contient des cellules glanduleuses regroupées en ampoule et déversent leur sécrétions à la surface de la peau à travers le pore. [13]

- Les glandes :

Il y a deux sortes de glandes :

Glandes mucigènes

Elles se répartissent sur tout leur corps et secrètent un mucus qui permet le maintien en permanence l'humidité de la peau et une protection contre les agressions. [13]

Glandes parotides

Plus volumineuses et granuleuses que celle de la précédente. Elles apparaissent sous la forme de pustules à la surface du corps. Son rôle consiste à la sécrétion volontaire du venin mais celui-ci possède aussi des propriétés antiseptiques et antibiotiques très utiles aux amphibiens.

Chromotophores

Les chromotophores sont les cellules responsables de la coloration vive des Amphibiens. Par la contraction ou par la dilatation de ces cellules que les Amphibiens peuvent changer de couleur. [13]

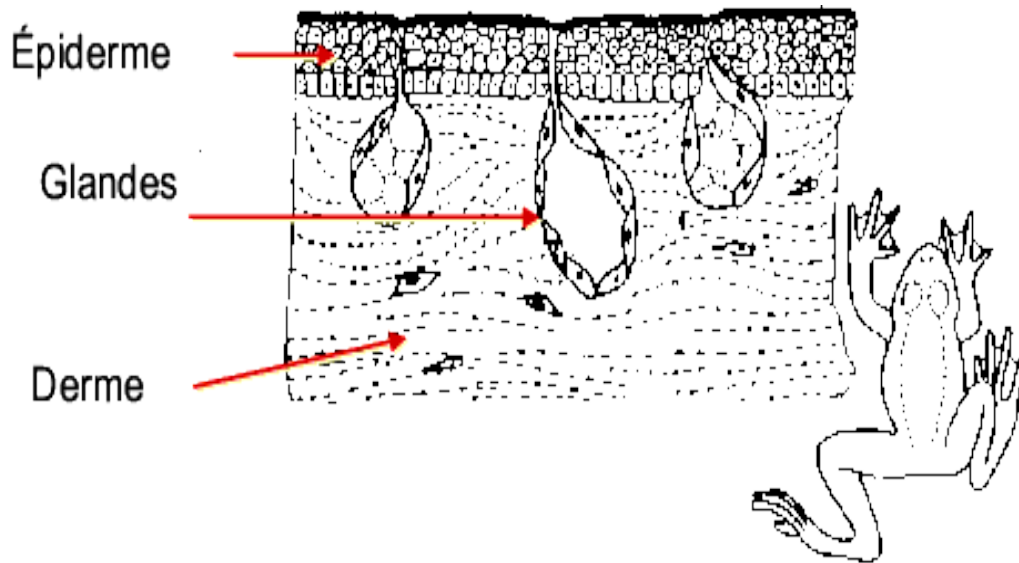


Figure 5: Photo d'un tégument

Source : MORIN Antoine.

I-2-4- Dimorphisme sexuel

- Chez *Boophis madagascariensis*

Le mâle possède un organe de fixation, il avait une taille inférieure à celle de la femelle [Figure n°6].



Figure 6: Photo d'un mâle (gauche) et une femelle (droite) *B.m.*

Source : RABIBISOA Nirhy.

- Chez *Mantidactylus betsileanus*

La distinction entre le mâle et la femelle est basée sur la différence de taille du tympan et celle des yeux. Chez le mâle, la taille du tympan est supérieure à la taille de ses yeux tandis que chez la femelle, la taille du tympan est inférieure à celle des yeux.

La femelle se distingue aussi par la présence d'une glande fémorale. [Figure n°7].

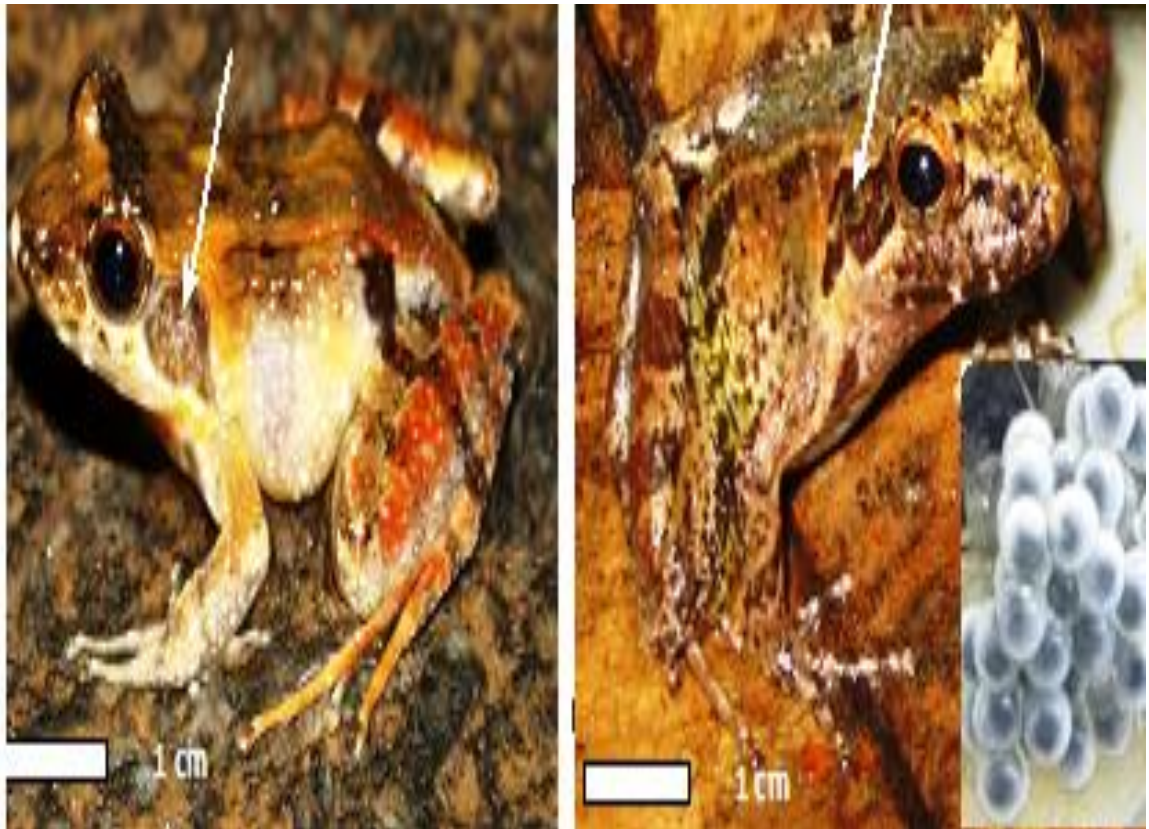


Figure 7: Photo d'un mâle et d'une femelle *Mantidactylus betsileanus*

Source : RABIBISOA Nirhy.

I-2-5- Cycle biologique

Les larves sont aquatiques tandis que les juvéniles poursuivent leurs croissances en milieu terrestre pour atteindre la maturité sexuelle. [17, 18] [Figure n°8]

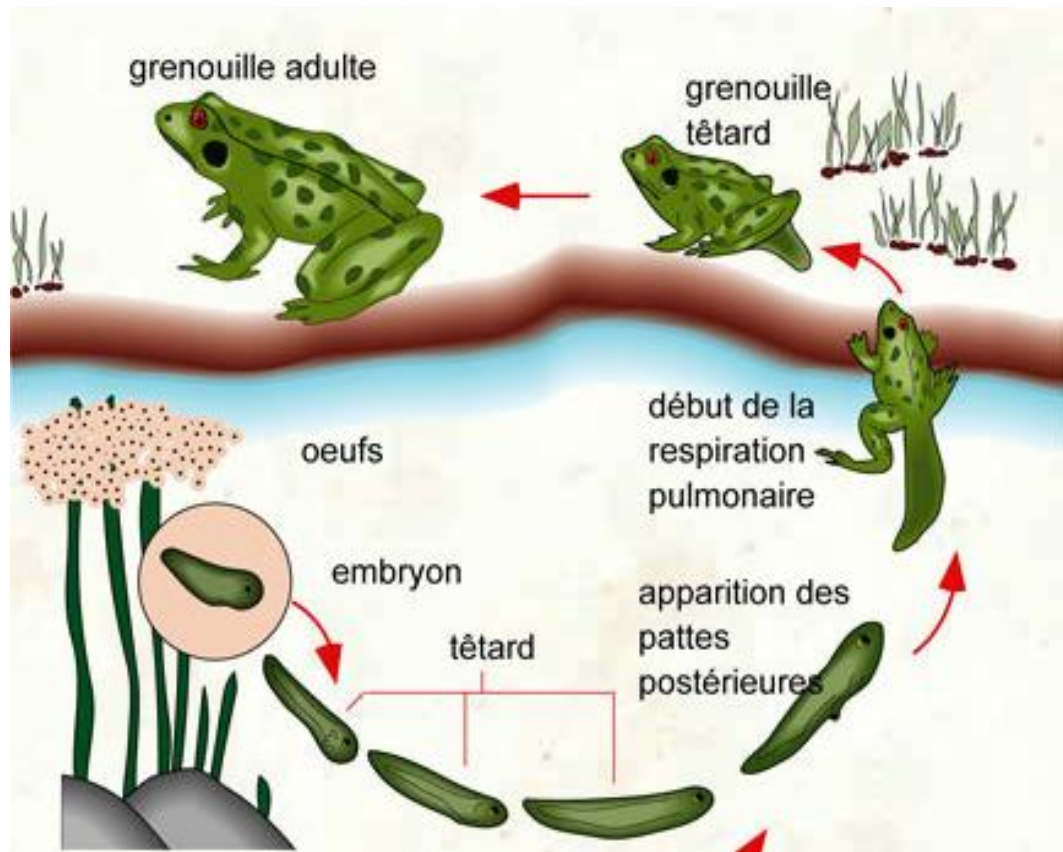


Figure 8: Schéma du cycle biologique des amphibiens.

Source : DERY Bernard.

I-2-6- Famille Mantellidae

Elles se subdivisent en trois Sous-familles

- les MANTELLINAE
- les BOOPHINAE et
- les LALIOSTOMINAE.

Tandis que les deux espèces étudiées appartiennent à la sous-famille de Boophinae (*Boophis madagascariensis*) et Mantellinae (*Mantidactylus betsileanus*).

I-2-6-1- *Boophis madagascariensis*

Cette espèce est répandue dans de nombreuses localités : l'Est de Madagascar, la Montagne d'Ambre, le nord en passant par Ambohitantely, le haut plateau central jusqu'au Parc National d'Andohalela, le Sud- Est. Il vit dans la forêt tropicale vierge et perturbée [15,19, 20].

Son couleur varie du beige au brun rouge avec des barres brun foncé [21] sur les membres et, parfois, une ligne sombre entre les yeux [figure n°9]. La partie ventrale est crémeuse [22]. Les mâles présentent un seul sac vocal. Deux éperons épidermiques évidents s'observent sur l'articulation tibio-tarsienne. Le mâle adulte mesure entre 50-65 mm tandis que la femelle est entre 70-80 mm



Figure 9: Photo de la partie dorsale du *Boophis madagascariensis*

Source : RABIBISOA Nirhy.

I-2-6-2- *Mantidactylus betsileanus*

C'est une espèce qui se trouve dans les forêts de moyenne altitude de l'Est de Madagascar. Elle est très répandue dans la forêt primaire et secondaire. [19]; L'articulation tibio-tarsienne peut atteindre le bout de son museau. Les disques terminaux des doigts et les orteils sont légèrement agrandis. [23] [24]

Dorsalement, la peau est modérément granulaire, avec des plis dorso-latéraux qui sont bien visibles. Sa coloration dorsale est très variable, souvent brun clair avec des taches plus sombres, avec ou sans rayures vertébrales, parfois avec des flancs oranges. Elle présente une pointe blanche distincte sur le museau [25] [figure 10]. La taille du mâle est inférieure (de 23 à 28 mm) à celle de la femelle (28-35 mm) [25].



Figure 10 : Photo de la partie ventrale du *Mantidactylus betsileanus*

Source : RABIBISOA Nirhy

I-3- Généralité sur la Chytridiomycose et la Probiotique

I-3-1- Chytridiomycose

I-3-1-1- Définition : étiologie- pathogénicité

La Chytridiomycose est une maladie infectieuse de la peau des amphibiens. Cette maladie contribue au déclin global des amphibiens en bloquant la respiration [figure n°11] ; Elle a été découverte pour la première fois en 1998 en USA puis en Australie et au Panama [3] [4] [23] [25], l'origine reste incertaine. Ce champignon a été repéré partout dans le monde actuellement et continue à infecter les amphibiens de la planète ; le réchauffement climatique accentue le surdéveloppement de ce champignon.



Figure 11: Photo des *Rana Mucosa* mortes à cause du *Bd*

Source : VREDENBURG.

I-3-1-2- Taxonomie de *Batrachochytrium dendrobatidis* responsable de la Chytridiomycose

REGNE : Champignon

CLASSE : Chytridiomycetes

ORDRE : Rhizophidiales

FAMILLE : Chytridiomycidae

GENRE : *Batrachochytrium*

ESPECE : *dendrobatidis*. Pressier L. & D.K. Nichols, 1999.

L'agent causal est un champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* appartenant à un groupe de moisissure qui décompose normalement les matières organiques. Aujourd'hui, il est capable de décomposer les kératines de la peau en attaquant toute la peau chez les adultes et la partie buccale chez les têtards [4]. Il agit en détruisant les cellules épidermiques par protéolyse.

Chez les amphibiens, la peau est l'une des organes ayant un rôle importante dans la respiration, l'hydratation, l'osmorégulation et la thermorégulation des amphibiens; Elle

est fine et perméable et la plupart des espèces respirent partiellement par la peau, la présence du champignon sur la peau entraîne une hyperkératose. Cet épaissement va nuire l'échange gazeux et entraîne l'asphyxie de l'individu [18].

I-3-2- Probiotique et bioaugmentation

La probiotique est une méthode qui a été utilisée avec succès pour atténuer le *Bd* dans les essais au laboratoire et sur le terrain. Il s'agit de donner aux amphibiens un bain [21] avec les bactéries qui peuvent tuer l'agent pathogène. Ces bactéries sont parmi les hôtes naturelles de la peau des amphibiens. [Figure n°12].

Quant à la bioaugmentation, elle consiste à augmenter le nombre de probiotique déjà trouvé sur l'hôte ou sur les hôtes de la même espèce. (Bletz et al.2013). Le but est de booster la fabrication, par la défense immunitaire des grenouilles, d'une bactérie anti-champignon qu'elles produisent sur la peau.



Figure 12: Photo d'un bain donné aux grenouilles au Sierra Nevada

Source : BLETZ Molly.

II-3-2-1- Rôle

Elle prévient l'envahissement du *Bd*. Une probiotique efficace doit inhiber le *Bd*, coloniser, persister et ne nuit pas l'hôte et ne causer aucun effet pour l'environnement. (Bletz et al.2013).

II-3-2-2- Principe

Phase 1: Collecte.

Phase 2 : Essais d'inhibition (déterminer si la bactérie isolée inhibe le *Bd*). [Figure n°13]

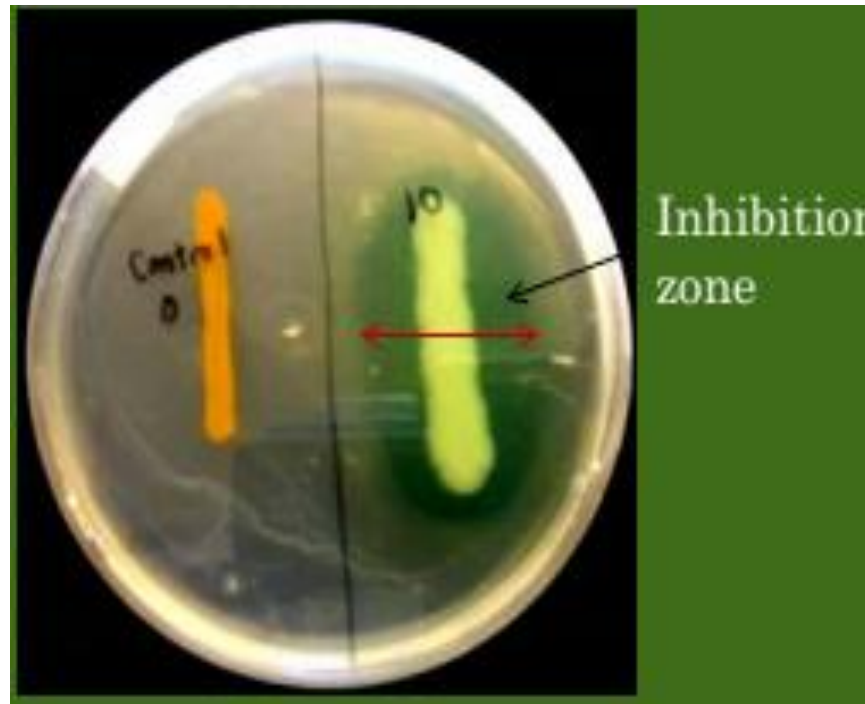


Figure 13: Photo d'une zone d'inhibition.

Source : BLETZ Molly.

Phase 3 : Essais de la persistance dans l'environnement. (Pour identifier les bactéries probiotiques persistantes dans un environnement approprié).

Phase 4 : Colonisation et essais de la persistance. (Pour déterminer le candidat probiotique qui colonise et persiste sur les espèces hôtes).

Phase 5 : Essais cliniques (pour savoir si le probiotique agit *in vivo* en inhibant l'infection par le *Bd*).

Phase 6 : Essais sur le terrain à petite échelle pour déterminer d'un côté si la probiotique introduite aux individus par le bain persiste dans les conditions naturelles et de l'autre côté déterminer si la probiotique inoculée dans un endroit localisé peut se transmettre sur les grenouilles.

II- DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

II-1- METHODES

II-1-1- Caractéristiques du site d'étude

L'étude s'est déroulée sur la partie Est de Madagascar dans les Parcs Nationaux de Madagascar : Andasibe et Ranomafana. [Figure n°14]

Andasibe ou Perinet, (18°93'90,9 et 48°42'29,5) se trouve à 145 km à l'Est d'Antananarivo. Ce lieu touristique devient célèbre du fait de la présence des lémuriens *Indri indri*. Il est aussi exceptionnellement riche en amphibien avec 84 espèces d'amphibiens [25]. De nombreux cours d'eaux y coulent. Le climat est de type tropical humide et pluvieux surtout entre le mois de Janvier et le mois de Mars

Ranomafana, (21°28'88,2 et 47°42'96,3), est une forêt humide étendue sur 43,500 Ha avec des collines et des pentes caractérisant la côte Est Malgache. Le parc National de Ranomafana était créé en 1991. Cette aire protégée est située à 60Km de Fianarantsoa en empruntant la bifurcation au niveau d'Ambohimahaso. Il abrite une grande richesse en biodiversité endémique et constitue un réservoir génétique de certaines espèces végétales rares. Ce parc portant le même nom du village où il y a une source thermale, « rano mafana » en malgache. Plusieurs espèces animales y ont été inventoriées dont 98 espèces d'amphibiens. La forêt de Ranomafana est une forêt pluviale et seules les parties éloignées de la route sont encore considérées comme de la forêt primaire. [26] [27].

Tableau I: Caractéristique géographique du site

Mois	Août		Août	Septembre
Lieu	Andasibe		Ranomafana	Andasibe
Site	Analamazaotra		Vatoharana	Analamazaotra
Latitude	18°93'90,9		21°28'88,2	18°93'53,1
Longitude	48°42'29'5		47°42'96,3	48°41'26,3
Élévation	946		1010	959
Habitat	Forêt, petit ruisseaux		Forêt primaire	Forêt
Période	nuit		nuit	nuit



Figure 14 : Site d'étude

Source : Auteur

Les points rouge sur la carte de Madagascar indiquent la commune d'Andasibe (en haut) et celle de Ranomafana (en bas). [Figure n°14].

II-1-2- Type d'étude

Il s'agit d'une étude descriptive et analytique. Une étude transversale a été menée pour identifier les familles des bactéries anti-*Bd* trouvées sur la peau de *Boophis madagascariensis* et *Mantidactylus betsileanus*.

II-1-3- Période étudiée

La rédaction du protocole a été commencée au mois de Juillet 2013.

La période d'étude s'étendait de fin Juillet à Septembre 2013.

-

II-1-4- Population étudiée

La population de l'étude était *Boophis madagascariensis* et *Mantidactylus betsileanus* d'Andasibe et Ranomafana; La population source était les amphibiens qui se trouvaient dans les deux endroits.

II-1-5- Critère d'inclusion et d'exclusion

III-1-5-1- Amphibiens

Tous *Boophis madagascariensis* et *Mantidactylus betsileanus* collectées étaient incluses dans l'étude.

Les têtards et les autres espèces ont été exclus.

III-1-5-2- Bactéries

Toute la famille des bactéries inhibitrices ou non était incluse.

II-1-6- Modes d'échantillonnage

Taille de l'échantillon :

Le nombre des vertébrés étudiés est en fonction du nombre des individus qui répondaient aux critères d'inclusion lors de la capture. Vingt-six individus ont été capturés durant l'étude. Vue la taille de la population, ils sont tous inclus dans les échantillons. (Une étude exhaustive).

II-1-7- Variables étudiées

La variable explicative était représentée par la description de l'amphibien [tableau I], leur environnement [tableau II], la famille de bactérie [tableau III].

Tableau II : Variables décrivant l'amphibien

Variable	Modalité	Observation
L'âge des animaux prélevés	Juvenile Adulte	Variable quantitative: indique l'âge des amphibiens prélevés
Le sexe des amphibiens prélevés	Mâle Femelle	Variable qualitative binaire: indique le sexe des amphibiens prélevés
Le poids des amphibiens prélevés	Poids	Variable quantitative continue discrétisée : indique le poids des amphibiens prélevés
Le SVL des amphibiens prélevés	SVL	Variable quantitative continue discrétisée : indique le SVL amphibiens

Tableau III: Variables décrivant leur environnement

Variable	Modalité	Observation
Milieu des amphibiens	Terrestre Arboricole	Variable qualitative nominale: décrit les milieux des amphibiens prélevés
Lieux d'études	Andasibe Ranomafana	Variable qualitative nominale: décrit les lieux d'études

Tableau IV: Variables décrivant la famille de bactérie trouvée

Variable	Modalité	Observation
Genres et espèces des bactéries	Genre	Variable qualitative nominale: décrit les bactéries prélevées
	Espèce	
Bactérie inhibitrice du <i>Bd</i>	Oui	Variable binaire : décrit les bactéries inhibitrices Chytride
	Non	

II-1-8- Modes de collecte des données

Les informations sont recueillies sur une fiche [Annexe 1], elle contient :

- les données géographiques (longitude, altitude du milieu, l'élévation, la température et l'habitat)
- Les données démographiques (sexe, âge)
- Les données morphologiques (SVL, poids)
- Les données biologiques (résultat de l'analyse bactériologique cutanée et les bactéries anti-*Bd*)

Les matériels utilisés sont : gant à usage unique, une règle pour mesurer le SVL, une balance pour peser leur poids, des microtubes, des sacs en plastique, une lampe frontale, une paire de botte, eau stérile, des cotons tiges et la fiche sous forme d'un tableau.

III-1-8-1- Observations et fouilles

Elles ont été réalisées tout le soir à partir de 19 h jusqu'à minuit en utilisant une lampe frontale à 4,5 V. La fouille consistait à explorer chaque branches d'arbres tout en inspectant soigneusement les feuilles et les ruisseaux suivant un transect bien défini susceptible d'héberger les animaux permettant d'observer tous les animaux.

III-1-8-2- Capture

Elle se fait durant la nuit en suivant les petits ruisseaux sur les 2 sites étudiés. Ils sont capturés à l'aide de la main portant un gant à usage unique. Les individus capturés sont placés ensuite une à une dans des sacs en plastique stérile.

III-1-8-3- Identification de l'espèce

L'identification est basée sur les caractéristiques de chaque espèce inclus dans cette étude; les paramètres prise en compte sont : la coloration, le type de la peau (lisse ou granuleuse), la taille, et la pointe blanche sur le museau pour *Mantidactylus betsileanus*. L'ouvrage intitulé « Fieldguide of Amphibians of Madagascar » était la référence.

III-1-8-4- Description morphologique

La mesure de la tête-corps ou SVL a été réalisée à l'aide d'une règle double décimètre tandis que la prise du poids de l'individu est obtenu à partir d'une microbalance en faisant une soustraction de l'ensemble sac-individu et le sac seulement.

SVL : la mesure se fait à partir de la pointe du museau jusqu'à la partie anale.

III-1-8-5- Collecte de prélèvement

Les individus appartenant à deux espèces ont été prélevés mais avant de les réaliser le frottis cutané, chaque individu capturé recevait un nettoyage avec de l'eau stérile. Les frottis prélevés étaient sur les deux parties ventrale du fémur et la face interne des deux pattes postérieures à l'aide d'un écouvillon stérile. [Figure n°15].



Figure 15: Photo de la technique du prélèvement cutané.

Source : BLETZ Molly.

Les prélèvements ont été stockés dans un microtube. Ils sont conservés sous glace. A la fin des prélèvements dans les deux sites, ils ont été envoyées par avion au laboratoire de l'Université James Madison en Etats-Unis où la mise en culture des bactéries ainsi que la mise en culture avec l'agent pathogène ont été effectuées. Les résultats sur les bactéries et le test d'inhibition ont été envoyés à Madagascar et présentés ici.

III-1-8-6- Mesure de biosécurité

Pour éviter la contamination de chaque individu, tous les matériaux utilisés étaient à usage unique. Le port de gant était obligatoire lors de la capture. Le gant a été changé après une collecte. L'eau utilisée pour laver chaque individu doit être stérile.

III-1-8-7- Analyse du frottis

Elle a été réalisée dans un laboratoire aux Etats-Unis.
Les étapes à suivre ont été les suivantes : [Annexe 2].

- La mise en culture des échantillons [figure n°16]

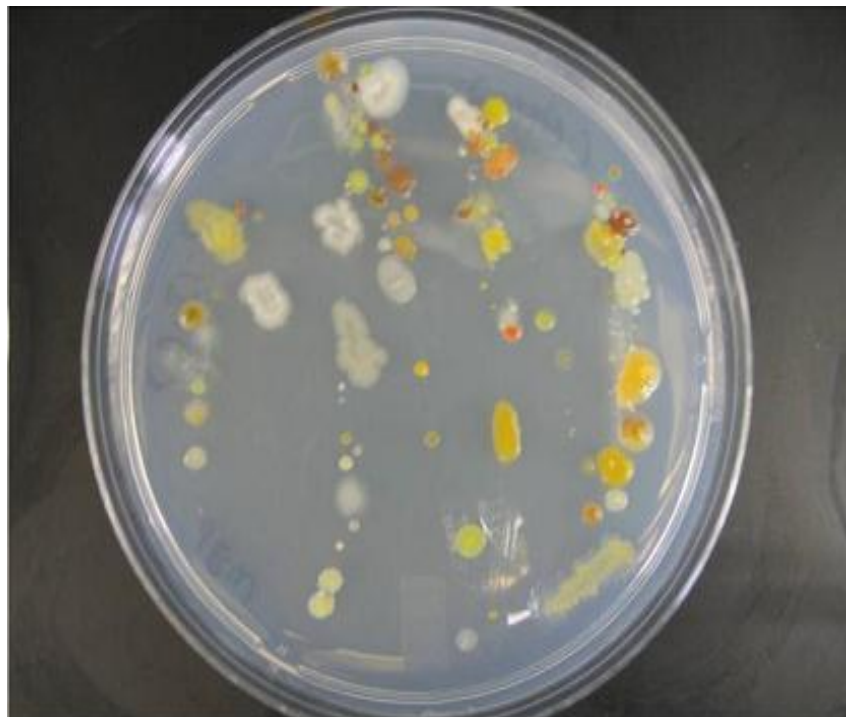


Figure 16: Photo de la culture des bactéries

Source : BLETZ Molly.

- L'isolation de chaque colonies de bactérie pour avoir une culture pure [figure n°17]



Figure 17: Photo de l'isolation des bactéries

Source : HEDETNIEMI et LIAO.

- Cryoconservation des isolats
- Extraction des ADN à partir d'une colonie pure isolée
- Amplification par le PCR
- Identification moléculaire des bactéries par séquençage
- Classification et identification des séquences bactériennes

Les bactéries qui ont été supérieure ou égales à 90% d'inhibition ont le pouvoir de tuer le Chytride. (Molly et al, 2013).

II-1-9- Calculs, tests statistiques utilisées, conditions d'application

III-1-9-1- Analyses statistiques des données

L'analyse des résultats a été traité avec le logiciel EPI INFO 7.1.5.0.

La variable dépendante (variable à expliquer) a été représentée par la bactérie anti- *Bd* et les variables indépendantes (variable explicatives) ont été représentées par les 8 variables tirées de la littérature.

III-1-9-2- Analyse univariée

Elle a permis de présélectionner parmi toutes les variables explicatives, les facteurs de risque potentiels. Le seuil de significativité défini était $p < 0,20$.

Cette analyse a été réalisée pour mettre en relation une à une chaque variable explicative avec la variable réponse. Toutes les variables ayant $p < 0,20$ ont été retenues pour l'analyse multivariée.

- **Test utilisé** : le test Khi-carré

Les analyses ont été testées par Khi carré (pour les variables qualitatives dont les effectifs théoriques d'une ou plusieurs cases du tableau de contingence sont supérieurs à 5) et par le Fisher exact (pour les variables qualitatives dont les effectifs théoriques d'une ou plusieurs cases du tableau de contingence sont inférieurs à 5).

À partir d'un tableau de contingence, on cherche à déterminer pour un facteur donné l'existence d'une inégalité significative entre le pouvoir d'inhibition du Chytride et les variables explicatives (tableau I, II, III).

Principe

Etape 1 : Poser une hypothèse

Soit x et y deux variables relatives dans l'étude avec ses modalités respectives

- Hypothèse nulle (H_0) : la proportion des modalités de x ne diffère pas suivant la proportion de y.
- Hypothèse alternative (H_1) : la proportion des modalités de x diffère suivant la proportion de y.

Etape 2 : calcul du test chi-carré

- O_{ij} : valeurs observées dans la cellule
- A_{ij} : valeurs attendues ou théoriques pour la cellule
- L_i : total des lignes
- C_i : total des colonnes
- ddl : degré de liberté
- n : effectif total

avec la formule : $\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_{ij} - A_{ij})^2}{A}$

Etape 3 : interprétation

Ho	probabilité	interprétation
Rejet Ho	$\chi^2 \text{ calculé} > \chi^2 \text{ table}$	Différence significative
Non rejet Ho	$\chi^2 \text{ calculé} < \chi^2 \text{ table}$	Pas de différence significative

III-1-9-3- Analyses multivariées

La régression logistique avait été réalisée pour cette analyse sur la version 7.1.5.0. d'EPI Info. Tout en tenant compte des variables explicatives retenues dans l'analyse univariée, une présélection, en examinant un modèle avec une seule variable explicative puis introduction une à une d'autres variables explicatives.

- Finalité

Pour voir si l'association des variables retenues de l'analyse univariée a une influence sur le pouvoir d'inhibition du Chytride.

A la fin de cette analyse, seules les variables significatives ont été retenues. Le seuil de significativité défini dans l'analyse multivariée était de $p < 0,05$.

- Le test utilisé lors de la régression logistique est l'Odds ratio.

II-1-10- Limite de l'étude

La réalisation de l'analyse bactériologique ainsi que la technique de qPCR a été réalisée à l'extérieur afin de ne pas introduire l'agent pathogène à Madagascar.

II-1-11- Considérations éthiques

Le protocole d'étude a été soumis sous l'autorisation de l'encadreur et le responsable de la conservation des amphibiens à Madagascar.

Lors de la descente sur terrain, le responsable de chaque Parc et les guides ont été informé sur l'objectif général de cette étude avant les collectes des grenouilles et le prélèvement. Toutes informations obtenues étaient ensuite confidentiellement gardées.

II-2- RESULTATS

II-2-1- Population explorée

L'étude a été réalisée sur deux espèces d'amphibiens : *Boophis madagascariensis* et *Mantidactylus betsileanus*.

Il a été retenu 26 amphibiens dont la répartition entre les deux espèces était la suivante : 8 *Boophis madagascariensis* et 18 *Mantidactylus betsileanus*.

Le tableau V a donné la distribution de la population d'étude selon les zones d'étude.

Tableau V : Répartition des amphibiens

Localité	Espèces étudiées	
	<i>Boophis madagascariensis</i>	<i>Mantidactylus betsileanus</i>
Andasibe	6	16
Ranomafana	2	2
Total	8	18

Au total, 8 *Boophis madagascariensis* et 18 *Mantidactylus betsileanus* ont été retenus.

II-2-2- Description des échantillons

II-2-2-1- Espèces d'amphibiens étudiés

- *Boophis madagascariensis*

La figure n°18 montre la photo *Boophis madagacariensis*



Figure 18 : Photo d'un mâle *Boophis madagascariensis*

Source: RABIBISOA Nirhy

- *Mantidactylus betsileanus*

La figure n° 19 présente l'espèce *Mantidactylus betsileanus*



Figure 19: Photo montrant un *Mantidactylus betsileanus*

Source: RABIBISOA Nirhy

II-2-2-2- Sex ratio

L'effectif par rapport au sexe des amphibiens étudiés est montré dans le tableau VI.

Tableau VI: Répartition de la population selon leur sexe

Sexe	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
Femelle	17	65,4	44,3-82,8
Mâle	9	34,6	17,2-55,7
Total	26	100	

Le nombre de femelle est nettement supérieur avec proportion de 65,4% contre 34,6% pour les mâles.

Le sex ratio est de 1/2.

II-2-2-3- Age

L'effectif par rapport à l'âge des amphibiens étudiés est montré dans le tableau VII.

Tableau VII : Répartition de la population selon leur âge

Age	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
Juvénile	11	42,3	23,4- 63,1
Adulte	15	57,7	36,9- 76,7
Total	26	100	

Les amphibiens à l'âge adulte ont été supérieurs avec 57,7% par rapport aux juvéniles.

II-2-2-4- Poids

Le poids des amphibiens étudiés a varié de 18 à 53 lbs avec une variance de 94,7 et un mode de 36.

II-2-2-5- SVL

La figure n°20 montre la répartition de l'ensemble des deux espèces en fonction de leur SVL.

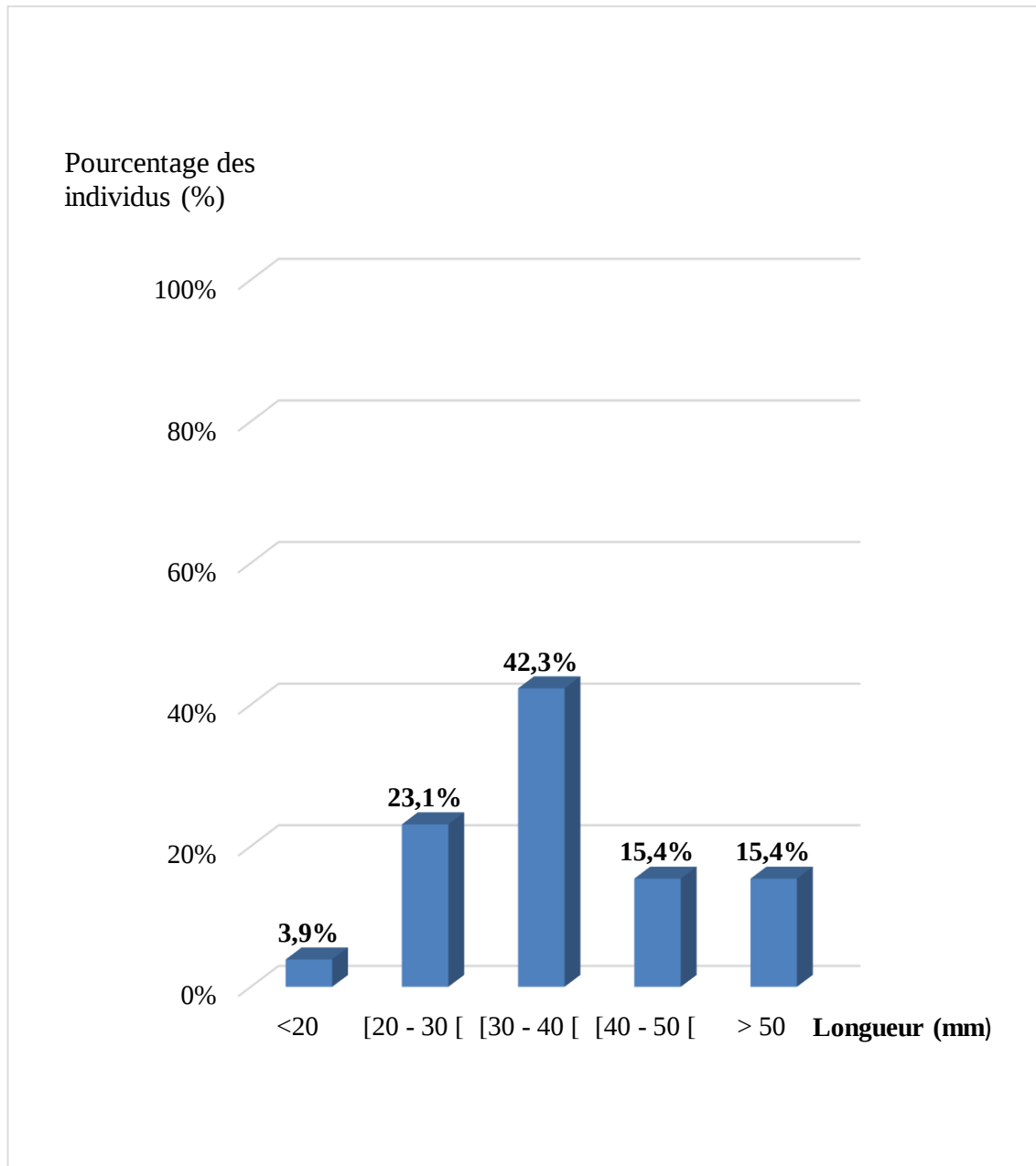


Figure 20: Répartition du SVL de l'ensemble des amphibiens

Plus de 42 % de l'ensemble des individus ont été compris entre 30 à 40 mm.

II-2-3- Etude des bactéries

III-2-3-1- Genre de bactérie chez *Boophis madagascariensis*

Au total, 27 genres de bactéries ont été observés chez *Boophis madagascariensis*. [Annexe 3].

Le genre de bactérie *Microbacterium* a prédominé avec une proportion de 25,9%, suivie de *Lesfonia*, *Gordonia*, *Bacillus* et *Nocardioides* avec la même proportion de 7,4% pour chaque genre.

III-2-3-2- Espèces de bactérie chez *Boophis madagascariensis*

Parmi les 27 espèces de bactéries chez *Boophis madagascariensis*, 20 espèces ont été répertoriées et 7 espèces sont non répertoriées, soit 25,9%. *M. Oxydans* a une proportion de 14,8% [Annexe 4].

III-2-3-3- Genres de bactéries chez *Mantidactylus betsileanus*

Chez *Mantidactylus betsileanus*, 86 genres de bactéries ont été rencontrés, tous répertoriés [Annexe 5].

Microbacterium a dominé avec 17,4%. *Chryseobacterium* et *Leifsonia* sont venus ensuite avec 7% chacun.

III-2-3-4- Espèces de bactérie chez *Mantidactylus betsileanus*

Quatre-vingt-six espèces ont été trouvées dont 62 répertoriées et 24 non encore identifiées [Annexe 6].

Les non répertoriés ont été à 27,9% de la proportion suivie de l'espèce *G.sputi* avec une proportion de 7%.

II-2-4- Pouvoir d'inhibition sur les Chytrides

III-2-4-1- Chez *Boophis madagascariensis*

- Inhibition du Chytride par rapport aux bactéries trouvées

La figure n° 21 présente le pouvoir d'inhibition des bactéries.

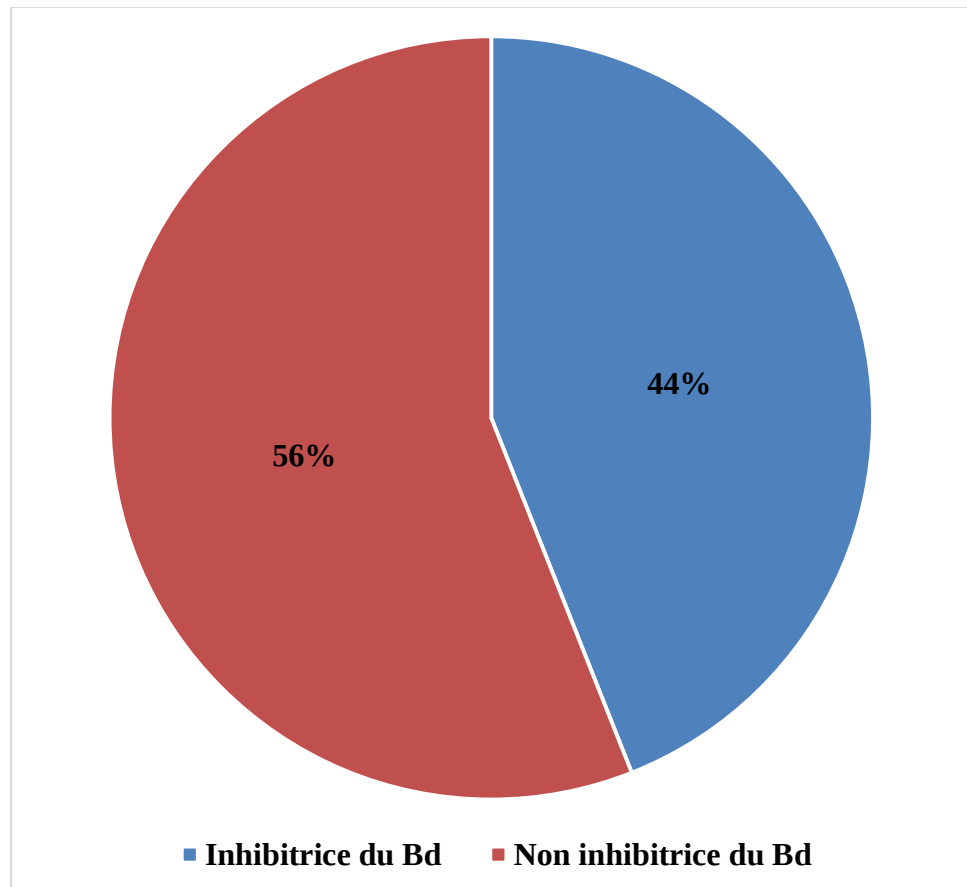


Figure 21: Bactéries inhibitrices ou non par rapport à tous les bactéries

Par rapport aux bactéries trouvées :

- Quarante- quatre pourcent des bactéries sur cette espèce ont eu le pouvoir d'inhibition du Chytride.

Et

- Les 56 % n'ont pas eu le pouvoir d'inhibition du Chytride.

- Par rapport à l'ensemble *Boophis madagascariensis*

La figure n° 22 montre le pouvoir d'inhibition des bactéries par rapport à l'ensemble *Boophis madagascariensis*.

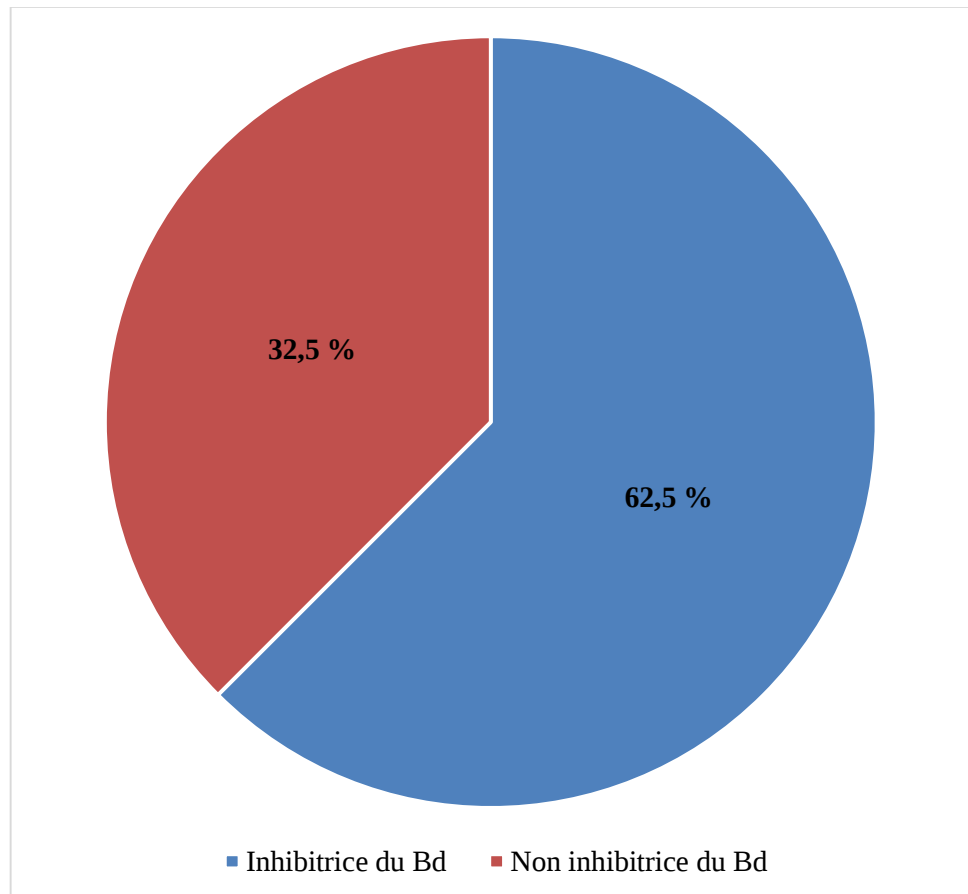


Figure 22: Bactéries inhibitrices du Chytride par rapport *B.m*

Par rapport à l'ensemble *Boophis madagascariensis*

- les 62,5% des bactéries ont été inhibitrices de l'agent pathogène *Bd*.
- Et les 32,5 % n'ont pas eu le pouvoir d'inhibition du Chytride.

III-2-4-2- Chez *Mantidactylus betsileanus*

- Par rapport aux bactéries trouvées

La figure n° 23 présente la proportion des bactéries qui inhibent ou non le *Bd*.

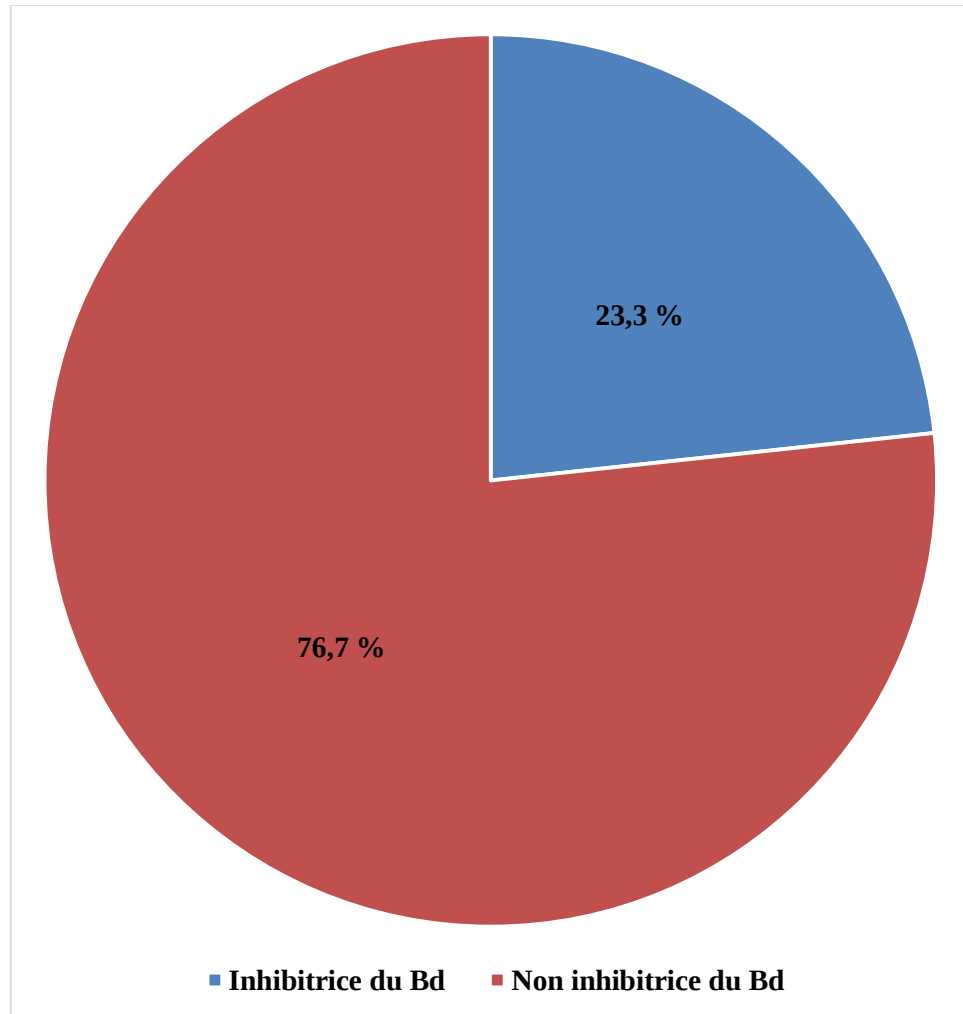


Figure 23: Inhibition ou non du Chytride chez *M.b*

Par rapport aux bactéries trouvées sur *Mantidactylus betsileanus*, les 76,7% des bactéries n'ont pas été inhibitrices du Chytride. Seules les 23,3 % ont eu le pouvoir d'inhibition du Chytride.

- Par rapport à l'ensemble de cette espèce

La figure n° 24 présente la proportion des bactéries inhibitrices ou non du *Bd* par rapport à l'ensemble de cette espèce.

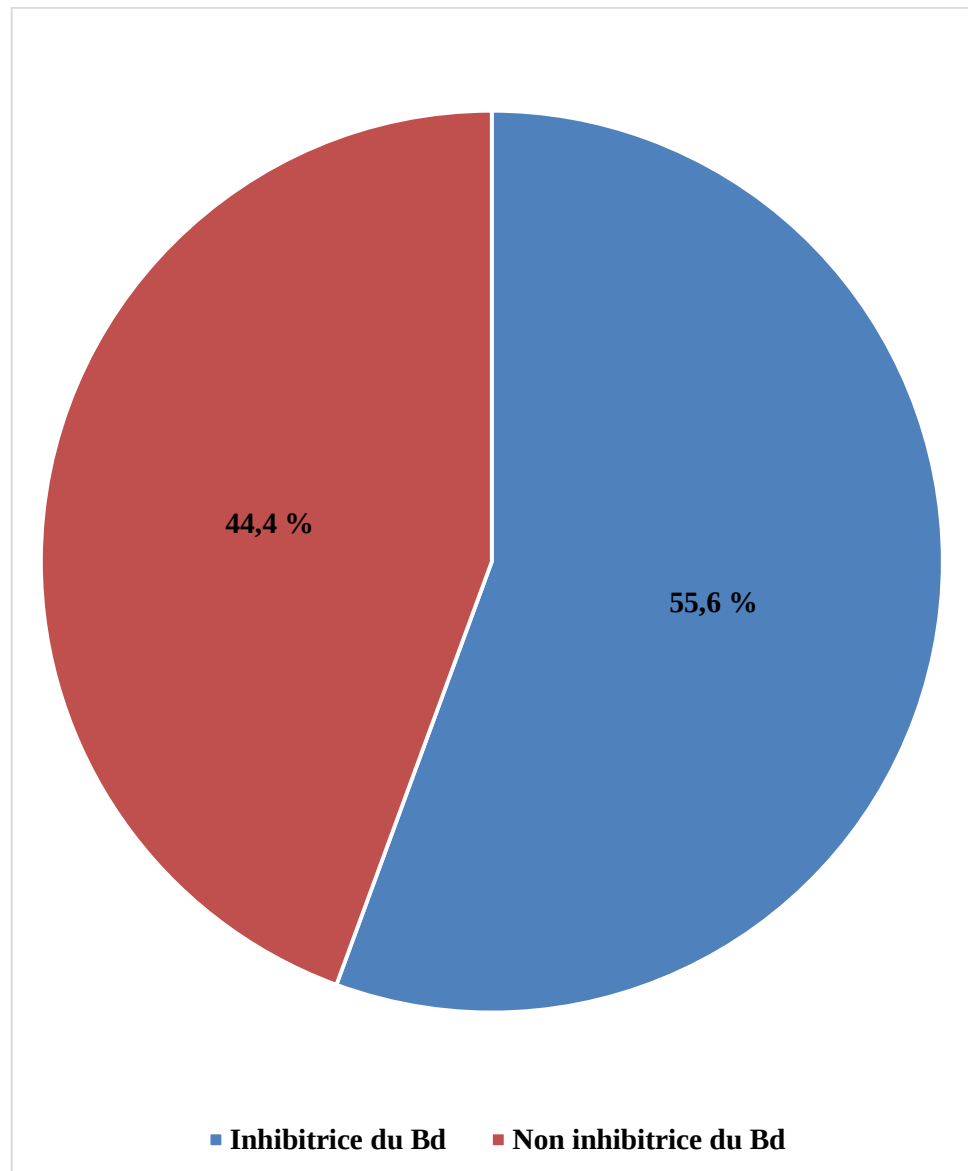


Figure 24: Bactéries inhibitrices ou non du Chytride par rapport *M.b*

Par rapport à l'ensemble du *Mantidactylus betsileanus*, les 55,6% des bactéries ont éliminé le Chytride.

II-2-5- Inhibition du Chytride chez les deux espèces

La figure n°25 montre la proportion d'élimination de la Chytridiomycose des deux espèces étudiées.

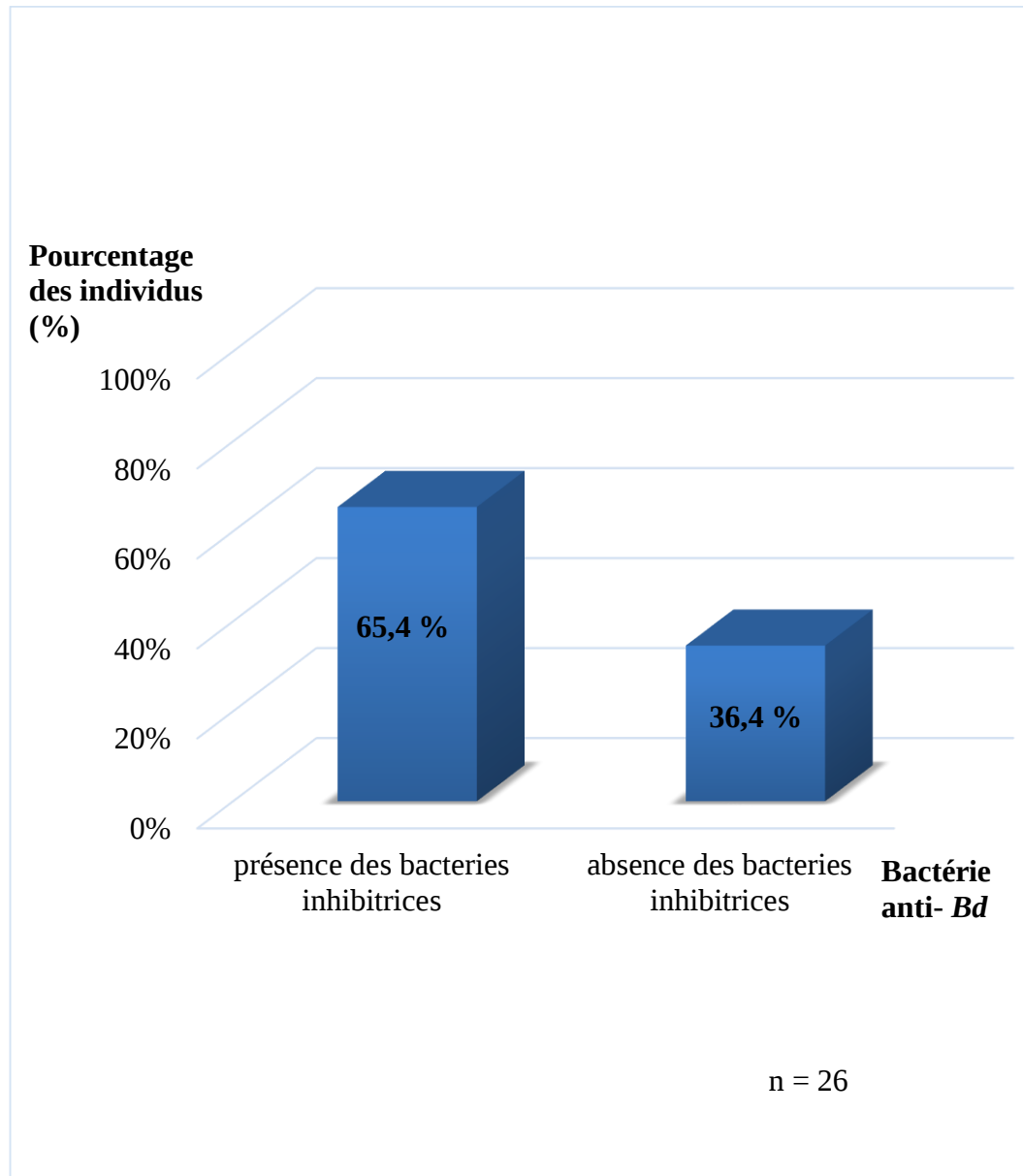


Figure 25: Proportion d'inhibition du Chytride chez les deux espèces

Soixante-cinq virgule quatre pour cent des individus de l'ensemble des deux espèces ont possédé des bactéries inhibitrices. Elle a été supérieure par rapport à celle des bactéries qui n'en a pas éliminé (soit 34,6%).

II-2-6- Bactéries inhibitrices du Chytride chez *B.m*

Le tableau VIII résume la répartition des bactéries inhibitrices du *Bd* chez *Boophis madagascariensis*.

Tableau VIII: Genre de bactérie inhibitrice du Chytride chez *B.m*

Nom de genre de bactéries	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
bactéries non inhibitrices	15	55,6	35,3- 74,5
<i>Microbactérium</i>	4	14,8	4,2- 33,7
<i>Gordonia</i>	2	7,4	0,9- 24,3
<i>Pantoea</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Staphylococcus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Kocuria</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Enterobacter</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Rhodococcus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Nocardioides</i>	1	3,7	0,1- 19
Total	27	100	

Vingt-sept genres de bactérie ont été trouvées. 15 genres des bactéries n'ont pas inhibé le Chytride [tableau n° VIII], soit 55,6%.

Huit genres de bactéries ont inhibé l'agent pathogène dont *Microbactérium* a une proportion de 14,8%, puis *Gordonia*, avec une fréquence de 7,4%, le reste a été à 3,7%.

II-2-7- Bactéries inhibitrices du Chytride Chez *M. b.*

Le tableau IX montre la répartition des bactéries qui inhibent la croissance du *Bd.*

Tableau IX: Répartition des bactéries inhibitrices chez *M.b*

Noms de genre de bactéries	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
bactéries non inhibitrices	66	76,7	66,4- 85,2
<i>Microbacterium</i>	6	7	2,6- 14,6
<i>Gordonia</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Pseudomonas</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Leifsonia</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Stenotrophomonas</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Streptomyces</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Chryseobacterium</i>	1	1,2	0,03- 6,3
<i>Pantoea</i>	1	1,2	0,03- 6,3
<i>Staphylococcus</i>	1	1,2	0,03- 6,3
<i>Variovorax</i>	1	1,2	0,03- 6,3
Total	86	100	

Parmi les 86 genres de bactérie trouvés chez *Mantidactylus betsileanus*, 66 n'inhibaient pas le Chytride, soit 76,7% [tableau n° XIII].

Vingt genres de bactéries ont la capacité d'inhiber le *Bd.*

Le premier a été *Microbactérium* avec 7% puis *Gordonia*, *Pseudomonas*, *Leisfonia*, *Stenotrophomonas* et *Streptomyces* l'ont suivi chacun avec 2,3%, le reste a été à 1,2%.

II-2-8- Analyse des facteurs influençant l'inhibition du Chytride

II-2-8-1- Analyse des facteurs associés dans l'inhibition des bactéries : milieu, poids, taille, âge et sexe.

Le tableau XIV résume le résultat de l'analyse du facteur d'inhibition selon le lieu d'étude.

Tableau X : Sélection univariée des variables selon le lieu d'étude

Inhibition de Chytrides							
	Non		Oui		Total		<i>p</i>
Locale	Nb	%	Nb	%	Nb	%	
Andasibe	9	45	11	55	20	100	0,05
Ranomafana	0	0	6	100	6	100	
TOTAL	9	34,6	17	65,4	26	100	

Le tableau XIV montre que :

- Pour Andasibe, la proportion des amphibiens possédant des bactéries inhibitrices du Chytride ont été supérieure à celle des amphibiens qui n'en ont pas possédé. (55% contre 45%) quant à Ranomafana, la totalité des amphibiens ont eu des bactéries inhibitrices du Chytride. (100% contre 0%).

La différence est significative ($p : 0,05$).

Tableau XI : Sélection univariée des variables selon le poids

Inhibition de Chytrides							
	Non		Oui		Total		<i>p</i>
Poids	Nb	%	Nb	%	Nb	%	
< 3	4	57,1	3	42,9	7	100	0,16
> ou = 3	5	26,3	14	73,7	19	100	
TOTAL	9	34,6	17	65,4	26	100	

Le tableau XV montre :

- La proportion des amphibiens ayant un poids supérieure ou égale à 3 ayant des bactéries inhibitrices ont été supérieures à celle qui n'en a pas possédé. (73,68% contre 26,32%). La différence n'est pas significative ($p : 0,16$).

Tableau XII: Sélection univariée des variables selon le SVL

Inhibition de Chytrides							
	Non		Oui		Total		p
SVL	Nb	%	Nb	%	Nb	%	
<20= 0	0	0	1	100	1	100	0,2
[20; 30[= 1	4	66,7	2	33,3	6	100	
[30; 40[= 2	4	36,4	7	63,6	11	100	
[40; 50[= 3	0	0	4	100	4	100	
[50; 60[= 4	1	25	3	75	4	100	
TOTAL	9	34,6	17	65,4	26	100	

Le tableau XVI montre que:

- Pour les amphibiens [30 ; 40], la proportion des amphibiens possédant des bactéries inhibitrices du *Bd* a été supérieure à celle qui n'en a pas eu. (63,3 % contre 36,4%). La différence n'est pas significative ($p : 0,2$)

Tableau XIII: Sélection univariée selon l'âge des amphibiens

Inhibition de Chytrides							
	Non		Oui		Total		<i>p</i>
Age	Nb	%	Nb	%	Nb	%	
Juvénile	3	27,3	8	72,7	11	100	0,4
Adulte	6	40	9	60	15	100	
TOTAL	9	34,6	17	65,3	26	100	

Ce tableau XVII montre que :

- La proportion des adultes ayant eu des bactéries anti- *Bd* a été supérieure à celle qui n'a pas été anti-Chytride. (60 % contre 40%).

La différence n'est pas significative ($p : 0,4$).

Tableau XIV : Sélection univariée selon le sexe

Inhibition de Chytrides							
	Non		Oui		Total		<i>p</i>
Sexes	Nb	%	Nb	%	Nb	%	
Femelle	7	41,2	10	58,8	17	100	0,3
Mâle	2	22,2	7	77,8	9	100	
TOTAL	9	34,6	17	65,4	26	100	

Le tableau XVIII présente que :

- Chez le mâle, la proportion des amphibiens qui a eu des bactéries anti- Chytride a été supérieure à celle qui n'en a pas eu. (77,8% contre 22,2 %). La différence n'est pas significative ($p : 0,3$)

II-2-8-2- Analyse multivariée par régression

Tableau XV: Facteurs influençant l'inhibition le *Bd*

Variables	Odds Ratio	95%	C.I.	<i>p</i>
SVL2	1,79	0,44	7,24	0,41
locale (Yes/No)	3095911,2	0	>1,0E12	0,96
Poids2 (2/1)	3,17	0 ,12	79,49	0,48
CONSTANT	*	*	*	0,13

L'analyse multivariée a révélé que l'association des variables SVL ($p : 0,4$), locale ($p : 0,9$) et poids ($p : 0,4$) n'ont pas eu d'influence sur l'inhibition du Chytride. Il n'existe pas une différence significative.

Pour cette étude, l'association de ces variables explicatives n'a pas eu d'influence sur l'inhibition du Chytride.

III- TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

L'étude sur les amphibiens dans la partie Est de Madagascar a permis d'identifier pour la première fois les bactéries symbiotiques des grenouilles qui inhibaient la *Bd*. Elle rentre dans le cadre d'un projet d'étude des amphibiens.

En plus, Andasibe et Ranomafana sont parmi les aires protégées de la Grande Ile ; ils étaient connus par leur richesse en flore et en faune sauvage surtout [26- 28].

Cette richesse a attiré plusieurs touristes en visitant les parcs nationaux pour admirer la beauté de la nature.

Le tourisme devenait l'un des piliers de l'économie de Madagascar [29] mais la plupart des touristes ne savent pas l'existence du Chytride, soit 91,5 % [30]. Le développement du tourisme, à part le problème classique sur la destruction de l'habitat des amphibiens, peut être l'un des facteurs qui introduira le *Bd* à Madagascar [30, 31].

Une étude a montré que le *Bd* peut se développer à une température de 4°C, mais sa croissance est plus rapide entre 17 et 25°C [18, 19]. Ce preferendum thermique montre que notre zone d'étude est aussi favorable à l'introduction de la Chytridiomycose puisque la température locale dans la partie Est varie entre 14°C et 16°C. [31-34].

Comme le tourisme est l'un des piliers de l'économie de Madagascar, on recommande de sensibiliser les populations locales et informer les touristes qui visitent Madagascar face à cette maladie qui contribue au déclin des amphibiens en utilisant par exemple des affiches partout (aéroport, parcs nationaux, port, communes, fokontany). Ce serait mieux si l'Etat participera à cette lutte avec les différentes organisations environnementales.

L'échantillon n'est pas statistiquement représentatif de l'étude puisque le nombre des individus de chaque espèce était minime surtout l'espèce *Boophis madagascariensis*.

La raison est la période de la réalisation de l'étude, c'était durant la période hivernale, pendant laquelle, il devient difficile de trouver un bon nombre d'individu puisque les amphibiens sont en hibernation [35], ils s'enterrent même sous les écorces d'arbre ou sous les roches ou des ruisseaux. Mais cette étude a permis d'avoir une idée sur les bactéries de la peau des deux grenouilles.

Seul l'échantillonnage et le prélèvement cutané ont été effectués à Madagascar. Le reste a été fait dans le laboratoire de l'Université de James Madisson puisqu'il n'est pas bon d'emmener l'agent causal à Madagascar pour des raisons de biosécurité. [36]

Certains microbes sont des êtres-vivants inoffensifs, ils peuvent participer dans la digestion des aliments, le système immunitaire et à la production des oligo-éléments. [36] Chez les amphibiens, la manipulation des bactéries participent à assurer leur survie face à la maladie grâce à l'immunité innée. [37]

L'effet bénéfique apporté par cette étude apportera une mesure de prévention pour la survie des amphibiens.

Une étude sur les bactéries isolées sur la peau des salamandres (*Plethodon cinereus*) a permis de mettre en évidence la présence d'une bactérie inhibitrice de la Chytridiomycose. Ils ont trouvés que l'ajout du *Janthinobacterium lividum* avait éliminé la Chytride des individus atteints. (Keesing,et al.2010) [38, 39].

Des chercheurs ont répété cette étude avec une autre espèce, *Atelopus zeteki*, mais la bioaugmentation n'a pas protéger la grenouille. [40]

Par la méthode probiotique, 44,4% des bactéries avaient inhibé l'agent pathogène après la mise en culture avec le *Bd* chez *Boophis madagascariensis* contre 23,3% chez *Mantidactylus betsileanus*.

Les deux espèces possèdent trois genres de bactéries inhibitrices en commun qui étaient *Microbacterium*, *Gordonia* et *Staphylococcus*.

Les bactéries probiotiques sont spécifiques, elles doivent se convenir avec la grenouille hôte. Elles agissent positive uniquement pour une même espèce.

Les amphibiens jouent un rôle important dans l'équilibre de l'écosystème (Semlitsch et Rothermel, 2003) ; aux yeux des publics, ils sont attrayants par leur couleur et leur comportement. Leur déclin actuel indique une vaste disparition de la biodiversité.

Leurs présences dans une Région permettront d'avoir une conservation de la biodiversité locale [41].

Ils agissent aussi comme agents de luttés contre les invertébrés nuisibles. Ils sont indicateurs utiles des effets du réchauffement de la planète et de la dispersion des infections parasitaires et fongiques. [42] [43].

Le lieu d'étude se révèle comme l'un des facteurs d'inhibitions mais aucune publication n'a montré qu'il est l'un des facteurs qui influence l'élimination de la maladie. Une étude plus approfondie est nécessaire.

Cette étude est la première sur l'espèce *Boophis madagascariensis* et *Mantidactylus betsileanus*. Aucune référence n'est encore documenté jusqu'à maintenant. De ce fait, ce serait mieux s'il y aura encore d'autres études similaires à réaliser pour aider à comprendre les facteurs qui influencent l'élimination de la Chytridiomycose à Madagascar à travers d'une étude de bioaugmentation confinée.

Le poids et le SVL se révèlent comme des facteurs de risques potentiels parmi les autres variables explicatives. Ils ont été retenus pour l'analyse multivariée avec le lieu d'étude.

CONCLUSION

Dans le cadre de cette étude, il a été observé que les deux espèces de grenouilles hébergent de nombreuses bactéries cutanées. L'essai d'efficacité avec la mise en culture avec le *Bd* a montré que parmi les 86 genres de bactéries, chez *Mantidactylus betsileanus*, 20 genres de ces bactéries (soit 23,3%) sont capables de tuer le Chytride. Chez *Boophis madagascariensis*, 8 genres de bactéries (soit 29,6%) parmi les 27 genres trouvés sur leur peau inhibent le *Bd*.

L'étude des facteurs influençant l'inhibition du Chytride est significativement liée au lieu d'étude. L'association des trois variables sélectionnés n'a pas d'influence sur l'inhibition du Chytride. (p calculé $> 0,05$).

Ce travail a été réalisé pour déterminer les bactéries qui sont symbiotes avec l'hôte.

Les résultats de cette étude contribuent aux connaissances de la famille des bactéries cutanées des deux grenouilles Malagasy et celles des bactéries probiotiques qui peuvent tuer l'agent pathogène [7] du Chytride.

Ils permettent aussi d'obtenir une médication de traitement d'attaque en cas de maladie. L'identification des bactéries anti- *Bd* aidera à l'application de la probiotique et la bioaugmentation en cas d'épidémie à Madagascar.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 2 - Bruno S, Ramahatra H. Biodiversité et Logique du Développement « Par » et « Pour » l'Ecotourisme à Madagascar. Madagascar : Cetri ; 2015.
- 3- Rabibisoa N, Raharivololona L. Plan Stratégique de Prévention et De La Lutte contre l'Introduction de Chytride à Madagascar. Conservation international, 2010 : 54.
- 4- Katharina C, Wollenberg, Richard KB, Jenkins, Randrianavelona R, Ralisata M., Rampilamanana R, Ramanandraibe A, Ramilijaona RO, Miguel V. Raising Awareness of Amphibian Chytridiomycosis will not alienate ecotourists Visiting Madagascar. Ecohealth; 2010; 7: 248-51.
- 5- Dejean T, MIAUD C, Ouellet M. La Chytridiomycose : une maladie émergente des amphibiens. Soc Herp Fr. 2010; 134: 27- 30.
- 6- Lam BA, Walke JB, Vredenburg VT, Harris RN. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. Biol Conserv. 2010; 143 : 529-31.
- 7- Harris RN, James TY, Lauer, A, Simon MA., Patel A. Inhibition du Chytride par les bactéries inhibitrices de la chytride. Rev Microbiol.2006 ; 3 : 53-6.
- 8- Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, et al. Prévention de la morbidité et la mortalité des amphibiens par les bactéries cutanées des amphibiens. ISME J. 2009. 3, 818-24.
- 9- Harris R. Des probiotiques à la rescousse des grenouilles. Agence Science- Presse. 2007 Mai.
- 10- Thirion JM. Guide des Reptiles et les Amphibiens. Paris : Belin ; 2012.

- 11- Michel B. Histoire naturelle des amphibiens. Paris : Biotope ; 2002.
- 12- Philipe L. Reptiles, Amphibien et Oiseaux Fossiles. France : Mnhn ; 2007.
- 19- Bustamante HM, Livo LJ, Carey C. Effects of temperature and hydric environment on survival of the Panamanian Golden Frog infected with a pathogenic chytrid fungus. Integr Zool. 2010; 5(2):143-53. DOI: 10.1111/j.1749-4877.2010.00197.x.
- 20- Nussbaum, R., Vallan, D. *Boophis madagascariensis*. The IUCN Red List of threatened Species. Conservation international. 2008, <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T57411A11632509>.
- 21- Glaw F, Vences M. Amphibians and Reptiles of Madagascar. Verlags GbR, Köln; 1994.
- 25- Benedikt S. Centre de Coordination pour la Protection des Amphibiens et des Reptiles des Suisses. Karch ; 2007.
- 27- Deanna CB, Patricia CW, Rasambainarivo TF, Summer J, Jonathan R, Thomas R. Pathogenic Enterobacteria in Lemurs Associated with Anthropogenic Disturbance. Am J Primatol. 2015; 77(3): 330–7, DOI : 10.1002/ajp.22348.
- 28- Ingenosya. Le Parc Nationa Ranomafana. Madagascar : Tourisme ; 2012.
- 29- Vectois. Le guide Madagascar. Madagascar: Tourisme; 2010.
- 30- Miaud C. Un champignon menace les amphibiens. Le courrier de la nature. 2013 ; 277 : 36, 37

- 31- Wollenberg KC, Jenkins RKB, Randrianavelona R, Rampilamanana R, Ralisata M, Ramanandraibe A, et al. On the shoulders of lemurs: pinpointing the ecotouristic potential of Madagascar's unique herpetofauna. *J Ecotourism*. 2011; 10(2): 101-17, DOI: 10.1080/14724049.2010.511229
- 32- Katharina, Wollenberg L, Richard KB, Jenkins, Randrianavelona RM., Rampilamanana R, Ramanandraibe A, Ramilijaona O, et al. Raising Awareness of Amphibian Chytridiomycosis will not alienate Ecotourists visiting Madagascar. 2010 ; 7 : 248-51. Galuchet M.
- 35- Torey KB, Storey JM. Molecular biology of freezing tolerance. *Compr Physiol*. 2013; 3(3):1283-308, DOI: 10.1002/cphy.c130007
- 36- Harris R, Molly B. Mitigating the potential extinction crisis of Malagasy frog communities from chytridiomycosis: selection of probiotics that inhibit *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Ecol Lett.*: 2013; 16 (6): 807-20, DOI: 10.1111/ele.12099.
- 37- Vredenburg VT, Briggs CJ, Harris R. Le rôle des microbes cutanés sur la santé et la maladie. National Academy Press, Washington D.C. (USA), 2011 342-55.
- 38- Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher TN, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KP. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol*. 2008 Nov; 34(11):1422-9, DOI: 10.1007/s10886-008-9555-7
- 39- Lam BA, Walke JB, Vredenburg VT, Harris RN. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *C Biology*. 2010; 143 (2): 529-31, DOI: 10.1016/j.biocon. 2009. 11. 015.

- 40- Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon M, Billheimer D, Shakhtour B, Shyr Y, et al. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana mucosa*. *C Biology*. 2007; 138: 390-8, DOI: 10.1016/j.biocon.2007.05.004.
- 41- Becker MH, Harris RN, Minbiole KP, Schwantes CR, Rollins-Smith LA, Reinert LK et al. Towards a better understanding of the use of probiotics for preventing chytridiomycosis in Panamanian golden frogs. *Ecohealth*. 2011; 8(4):501-6, DOI: 10.1007/s10393-012-0743-0.
- 42- Bourgeois PA. L'importance des amphibiens pour la conservation des petits fragments dans les forêts tropicales [thèse]. Biologie : Quebec ; 2008. 98p.
- 43- Wilson-Smith A. Importance biologique des amphibiens. Canada : Redpath ; 2013

WEBOGRAPHIES

- 1- Jean-Christophe V, Craig HT, Simon NS. Wildlife in a changing world. IUCN [en ligne]. 2011 Octobre [consulté le 18 janvier 2014] ; 1(1) : [1 page]. Consultable à l'URL : <http://www.conservation-nature.fr/article2.php?id=125>.
- 14- Clairambault P, Janvier P, Rage JC, Amphibiens ou Batraciens. Encyclopaedia Universalis [en ligne]. 2015 Juillet [consulté le 24 /09/2015]. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/amphibiens-batraciens>.
- 13- Houdan. Association Terroir et Nature en Yvelines. Connaissance générale des batraciens. Atena [en ligne]. 2015 Juillet [Consulté le 01/08/2015] ; 1(1) [01 page] Consultable à l'URL <http://www.terroir-nature78.org/batraciensengene/index.html>
- 15- Taupo. Rentabilisation du Strange and Funky. La classification du lissamphibien. Microbiol. [en ligne] 2011 Novembre [consulté le 06 Janvier 2014] ; 1(1) [1 page] consultable à l'URL : <http://ssaft.com/Blog/dotclear/index.php?tag/Gymnophione>

- 16- Marie E. Les Maladies Infectieuses et Parasitaires des Amphibiens [thèse]. Science : Paris XIII ; 2005. 150 p.
- 17- Dulce R. Les vertébrés Amphibiens. Baary [en ligne]. 2009 Mars [consulté le 19/05/2015] ; 1.1 [1 pages]. Consultable à l'URL : www.barry4kids.net/TEMAS/FR/anfibios_fr.html
- 18- Charrion N. La Société Nationale de Protection de la Nature. Biosfera [en ligne]. 2014 Juillet [consulté le 18/05/2015] ; 1.1 : [2 pages]. Consultable à l'URL : www.snpn.com/spip.php?rubrique208
- 22- Renck JL. La probiotique. Biologiste et Ecrivain Scientifique ; [en ligne]. 2001 Mai [consulté le 06 Janvier 2014] 1(1) [1 page] Consultable à l'URL : <http://www.francecarpekoibassin.com/blog/la-probiotique-par-jean-luc-renck-biologiste-et-ecrivain-scientifique>
- 23- Mattison C. *Boophis madagascariensis*. La partie dorsale. Books llc [en ligne]. 2007 Septembre [consulté le 06 Janvier 2014] ; 1(1) [1 page] Consultable à l'URL : <http://www.arkive.org/boophis/boophis-madagascariensis/image-G86149.htm>.
- 24- Hakoar. *Boophis madagascariensis*. La partie ventrale des *Boophis madagascariensis*. Dreamtime [en ligne]. 2000 Mai [consulté le 04 Avril 2014] ; 1 (1) [1 page] consultable à l'URL : <http://fr.dreamstime.com/photographie-stock-madagascariensis-de-boophis-andasibe-image26869822>.
- 26- Kilgann J. Aquariomania. Lutte contre la chytridiomycose. Karch [en ligne]. 2007 Octobre [consulté le 02 Avril 2015] ; 1(1) [1page]. Consultable à l'URL : <http://www.aquariomania.net>
- 33- Crédits et bibliographiques. Deux Sèvres Nature et Environnement : Le Web des Amphibiens. [en ligne]. 2008 Mars [consulté le 06/06/2015] ; 1 (1) [3pages] consultable à l'URL : <http://www.dsne.org/webamph/index.html>

- 34- Dumas C. La disparition des grenouilles liée au changement climatique. Nature et Science [en ligne].2006 Janvier [consulté le 26 Octobre 2015] ; 1(1) : [1pages]. Consultable à l'URL : <http://www.sciencesetavenir.fr/nature-environnement>.



ANNEXES

Annexe 1 : Questionnaire sur l'identité, les caractères généraux de chaque individu, leur habitat:

1-1- Fiche collecte de données :

espèce	identité	localité	sexe	âge	poids	SVL
<i>Mantidactylus betsileanus</i>	Mb1					
	Mb2					
	Mb3					
<i>Boophis madagascariensis</i>	Bm1					
	Bm2					
	Bm3					

1-2- Sexe

id	Glande fémorale	Pas de glande fémorale

1-3- Fiche sur leur Habitat

Site	Latitude	Longitude	Elevation	Habitat
Andasibe				
Ranomafana				

1-4- Fiche sur l'effectif capturé dans les deux sites

	Andasibe	Ranomafana
<i>Mantidactylus betsileanus</i>		
<i>Boophis madagascariensis</i>		
N		

Annexe 2 : Méthode swabbing

Matériel utilisé :

- Une paire de ciseaux
- Un écouvillonnage
- Des microtubes
- Une paire de gant à usage unique et une paire de botte
- De l'eau stérile
- Un sac plastique à usage unique
- Un conservateur : accumulateur

Technique :

- Capture de l'individu et le mettre dans le sac plastique (identifier l'espèce)
- Port de gant stérile pour chaque individu
- Tenir l'individu, face ventral en haut
- Frotter 10 x sur le ventre et sur la face ventrale de la patte postérieure gauche et droite
- Le gant déjà utilisé doit être jeté dans la poubelle.

Annexe 3 : Note et protocole

There are seven main step performed in the lab : cultivating the preserved samples, isolating unique bacterial colony from each sample, cryoconservation of isolates, DNA extraction from pure culture isolates, PCR amplification of 16 s RNA and molecular identification of bacteria through sequencing, classifying and identifying the bacterial sequences. These steps are explained below:

Step 1: cultivating preserved samples:

- Unthaw sample from freezer.
- Shake for 5 -10 sec.
- In a laminar flow biosafety cabinet (sterile environment), pipet 20 ul of TSYE glycerol solution and release liquid onto the surface of a 1 % tryptone plate.
- Using a steril loop, smear liquid across the surface evenly until plate surface is dry.
- Replace the lid on the plate and wrap in parafilm to maintain moisture.

- Place in incubator (23C).

This are mass culture plates.

Step 2: isolating unique bacteria colonies:

- After 3 days of incubation, visually examine each mass culture plate for bacterial growth.
- Using a steril loop, each morphologically distinct isolate into pure culture.
- Check each mass culture plate every other days for 2 weeks for new bacterial colonies.
- Isolate new colonies is given known identification code.
- Record to color, texture, surface morphology, and shape or each isolate.

Step 3: cryoconservation of isolates protocol:

After bacteria are isolated into pure culture, it will be cryopreserved for later use

- Using a sterile loop, gather a loop full of bacterial growth from tryptone plate.
- Place the bacteria into a tube containing 1.5 ml of TYSE + glycerol solution (sake to dislodge bacteria from loop).
- Each isolate will be frozen in duplicate, so repeat in a second tube.
- Leave tubes on bench top at room temperature for 1- 24 h and then transfer the preserved bacterial isolates to -80 freezer.

Step 4: DNA extraction from pure culture isolates (prepman protocol):

After bacteria are isolated into pure culture, DNA will be extracted from the bacteria in order to identify the species of bacteria.

- Using a sterile loop, gather a loop full of bacterial growth from tryptone plate.
- Place the bacteria into a microcentrifuge tube containing 100 ul of Prepman Ultra solution (Applied Biosystem) (sake to dislodge bacteria from loop).
- Vortex or shake vigorously for 30 seconds;
- Heat sample to 99-100 C for 10 mn in a heat block.
- Let coll for 2 mn.
- Transfer 50 ul of the supernant into a new microcentrifuge tube.
- Store DNA sample at – 20 C PCR processing.

Step 5: PCR amplification of 16 r RNA gene from pure culture DNA:

PCR amplifies a certain region of the bacterial DNA used for identification purposes

- Set up PCR reaction ingredients, in 0.2 ml PCR tubes

Ingredient for PCR:

10 ul of 5 prime faststar master mix

1 ul primer -8F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3')

1 ul primer 1492R (5'- GTT TAC CTT GTT ACG ACT -3')

12 ul PCR – grade water

1ul DNA template (DNA extract)

- Perform the PCR using a PCR machine platform.

1 cycle	94C	4 mn
---------	-----	------

30 cycles	94 C	1 mn
-----------	------	------

	50 C or 53 C	1mn
--	--------------	-----

1cycle	72 C	10 mn
--------	------	-------

- Run PCR products on 2% agarose gel to confirm successful amplification.

Step 6: Molecular identification of bacteria through sequencing:

PCR products of every bacterial isolate that was successfully amplified was sent to

Eurofins Operon DNA Sequencing Center for sequencing:

<http://www.operon.com/services/getting-started.aspx>

Step: 7 classifying and identifying the bacterial sequences:

- To obtain sequence information for each isolate is downloaded into a program called BioEdit.
- Within this program, sequences are checked for quality and trimmed in preparation for identification
- Once the sequence is cleaned in the BioEdit program, a web interface called Greengenes (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast_interface.cgi) _ is used to search and compare the bacterial sequence of our isolated to known bacteria species to assign and identify to our unknown isolates.

- The web interfaces generates an output with bacterial specis that most closely match our bacterial isolates and assigns a percent match to the output. Higher percent match score indicate high similarity between the sequences.

Annexe 3 : Répartition du genre de bactéries identifiées chez *B.m*

Genre	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
Non identifié	1	3,7	0,1- 19
<i>Microbacterium</i>	7	25,9	11,1- 46,3
<i>Bacillus</i>	2	7,4	0,9- 24,3
<i>Gordonia</i>	2	7,4	0,9- 24,3
<i>Leifsonia</i>	2	7,4	0,9- 24,3
<i>Nocardioides</i>	2	7,4	0,9- 24,3
<i>Chryseobacterium</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Erwinia</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Staphylococcus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Plantibacter</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Kocuria</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Enterobacter</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Rhodococcus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Brachybacterium</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Terracoccus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>Cellulomonas</i>	1	3,7	0,1- 19
Total	27	100	

Annexe 4 : Répartition des espèces de bactérie trouvées sur *B. m*

Espèces	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
<i>sp.</i>	7	25,93	11,1- 46,3
<i>M. oxydans</i>	4	14,81	4,2- 33,7
<i>G. aichiensis</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>P. flavus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>M. hatanonis</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>C. humilata</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>N. hwasunensis</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>M.hydrocarbonoxydans</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>inconnue</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>P. kaohsiungensis</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>K. marina</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>N. oleivorans</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>B. paraconglomeratum</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>E. persicina</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>S. saprophyticus</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>B. soli</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>R. tukisamuensis</i>	1	3,7	0,1- 19
<i>L. xyli</i>	1	3,7	0,1- 19
Total	27	100	

Annexe 5: Répartition des genres de bactéries trouvées sur *M.b*

Genre	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
<i>Microbacterium</i>	15	17,4	10,1- 27,1
<i>Chryseobacterium</i>	6	7	2,6- 14,6
<i>Leifsonia</i>	6	7	2,6- 14,6
<i>Stenotrophomonas</i>	6	7	2,6- 14,6
<i>Gordonia</i>	5	5,8	1,9- 13,1
<i>Janibacter</i>	5	5,8	1,9- 13,1
<i>Pseudomonas</i>	5	5,8	1,9- 13,1
<i>Staphylococcus</i>	5	5,8	1,9- 13,1
<i>Streptomyces</i>	5	5,8	1,9- 13,1
<i>Brevundimonas</i>	4	4,7	1,3- 11,5
<i>Acidovorax</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Bacillus</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Erwinia</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>Gordonia</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Acinetobacter</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Variovorax</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Agrobacterium</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Starkeya</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Pantoea</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Sphingomonas</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Hymenobacter</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Dyemonas</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Kaistia</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Rhodopseudomonas</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Plantibacter</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Roseomonas</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Bosea</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Mycobacterium</i>	1	1,2	0- 6,3

(Suite)

Genre	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
<i>Agromyces</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Cryocola</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>Kocuria</i>	1	1,2	0- 6,3
Total	86	100	

Annexe 6 : Répartition des espèces de bactéries chez *M.b*

Espèces	Nombre	Fréquence (%)	IC 95% (%)
<i>sp,</i>	24	27,9	18,8- 38,6
<i>G. sputi</i>	6	7	2,6- 14,6
<i>S. maltophilia</i>	5	5,8	1,9- 13,1
<i>S. saprophyticus</i>	4	4,7	1,3- 11,5
<i>B. nasdae</i>	4	4,7	1,3- 11,5
<i>M. sanguinis</i>	3	3,5	0,7- 9,9
<i>oxydans</i>	3	3,5	0,7- 9,9
<i>M. lacticum</i>	2	2,3	0,3- 8,2
<i>P. agglomerans</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>G. allium</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>C. antiquus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>M. aurum</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>A. avenae</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>M. chokolatum</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S.clavuligerus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S. cohnii</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>P. flavus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S.floridae</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>C. gregarium</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S.griseoluteus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S.hygroscopicus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>C. indologenes</i>	1	1,2	0- 6,3

(Suite)

Espèces	Nombre	Fréquence (%)	IC 95 % (%)
<i>P. koreensis</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>M. laevaniformans</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>P. lutea</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>K. marina</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>B. massiliensis</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S.microflavus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>R. mucosa</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>R. palustris</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>V. paradoxus</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>E. persicina</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>L. pindariensis</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>P. plecoglossicida</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>A. rhizosphaerae</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>P. rhodesiae</i>	1	1,2%	0- 6,3
<i>M. schleiferi</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>B. simplex</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>D. todaii</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>M. trichotecenolyticum</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>A. tumefaciens</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>L. xyli</i>	1	1,2	0- 6,3
<i>S. yunnanensis</i>	1	1,2	0- 6,3
Total	86	100	

VELIRANO

« Eto anatrehan'i Zanahary, eto anoloan'ireo mpikambana ao amin'ny Holafitra Nationalin'ny Dokotera Veterinaire Malagasy sy ireo mpampianatra ahy, mianina aho fa hitandro lalandava ary hatraiza hatraiza ny haja amam-boninahitry ny Dokotera Veterinera sy ny asa. Noho izany dia manome toky ary mianiana aho fa :

- a. Hanatanteraka ny asako eo ambany fifehezan'ny fitsipika misy ary hanaja hatrany ny rariny sy ny hitsiny ;
- b. Tsy hivadi-belirano amin'ny lalàn'ny voninahitra, ny fahamendrehana, ny fanajanany rariny sy ny fitsi-pitondran-tena eo am-panatanterahana ny asa maha Dokotera Veterinera.
- c. Hanaja ireo nampianatra ahy, ny fitsipiky ny hai-kanto. Hampiseho ny sitraka sy ny fankatelemana amin'izy ireo ka tsy hivaona amin'ny soa nampianarin'izy ireo ahy ;
- d. Hanaja ny ain'ny biby, hijoro ho toa ny andry hiankinan'ny fiarovana ny fahasalaman'izy ireo sy ho fanatsarana ny fiainany ary hikatsaka ny fivoaran'ny fahasalaman'ny olombelona sy ny toe-piainany ;
- e. Hitazona hoahy samirery ny tsiambaratelon'ny asako ;
- f. Hiasa ho an'ny fiarovana ny tontolo iainana sy hiezaka ho an'ny fisian'ny fiainana mirindra ho an'ny zavamanan'aina rehetra ary hikatsaka ny fanatanterahana ny fisian'ny rehetra ilaina eo amin'ny fiaraha-monina tsy misy raoraon'olombelona sy ny biby ;
- g. Hiezaka ahafehy ireo fahalalana vaovao sy hai-tao momba ny fitsaboana biby ary hampita izany hoan'ny hafa ao anatin'ny fitandroana ny fifanakalozana amin'ny hairaha mifandray amin'izany mba hitondra fivoarana ho azy;
- h. Na oviana na oviana na oviana aho tsy hanaiky hampiasa ny fahalalako sy ny toerana misy ahy hitondra ho any amin'ny fahalovana sy hitarika fihetsika tsy mendrika. Ho toavin'ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanterak'izany velirano nataoko. Ho rakotry ny henatra sy horabirabian'ireo mpiray asa amiko kosa raha mivadika amin'izany.