

IV.3.1. Les Aéromonoses	16
IV.3.2. Les Vibrises	16
IV.3.3. La Furonculose	17
V. Effet de l'ingestion des poissons contaminés chez les consommateurs.....	17
V.1. La maladie infectieuse	17
V.2. Toxi-infection alimentaire	18
V.3. Intoxication	18
V.4. Intoxination	19
VI. Pouvoir pathogène des bactéries étudiées	19
VI.1. Pouvoir pathogène des <i>Vibrios</i>	19
VI.1.1. <i>Vibrio cholerae</i>	19
VI.1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
VI.2. Pouvoir pathogène des <i>Aeromonas</i>	21
VI.3. Pouvoir pathogène des <i>Pseudomonas</i>	22
VI.4. Pouvoir pathogène des <i>Salmonella</i>	22
VI.5. Pouvoir pathogène des <i>Escherichia coli</i>	24
VII. Méthode d'analyse des bactéries.....	25
VII.1. Terminologie	25
VII.2. Culture bactérienne	26
VII.2.1. Test biochimique	27
VII.2.2. Technique MALDI-TOF	27
VII.2.3. Technique PCR	28
VII.3. Pathogénicité bactérienne	30
VII.3.1. Antibiorésistance	32
VII.3.2. Production de Toxines ou d'autres facteurs de virulences	32

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. METHODES.....	33
I.1. Cadre de l'étude	33
I.2. Type d'étude	36
I.3. Période d'étude	36
I.4. Population d'étude	36
I.4.1. Unité d'analyse	36
I.4.1.1. Critères d'inclusion	36
I.4.1.2. Critères d'exclusion	36
I.4.1.3. Taille et Mode d'échantillonnage	37
I.4.2. Unité d'échantillonnage	38
I.4.2.1. Critères d'inclusion	38
I.4.2.2. Critères d'exclusion	38
I.4.2.3. Taille et Mode d'échantillonnage	38
I.5. Paramètres étudiés.....	39
I.5.1. Prévalence	39
I.5.2. Recherche d'espèces bactériennes et sérotypage	40
I.5.3. Pathogénicité	40
I.5.3.1. Antibiorésistance	40
I.5.3.2. Production de toxines	41
I.6. Mode de collecte, d'analyse et de traitements des données	41
I.6.1. Mode de collecte des données	41
I.6.2. Mode d'analyse et de traitements des données	41
I.7. Matériels et Protocole analytique	42
I.7.1. Conditions de prélèvement	43
I.7.2. Protocole analytique pour l'obtention de la prévalence	43

I.7.2.1.	Mode opératoire pour la recherche des <i>Vibrios</i> et <i>Aeromonas</i> : selon la norme ISO/TS 21872 relatif à la Recherche de <i>Vibrios</i> potentiellement entéropathogènes	43
I.7.2.2.	Mode opératoire pour la recherche de <i>Salmonella</i> spp. : NF en ISO 6579 : Méthode horizontale pour.....	48
I.7.2.3.	Mode opératoire pour le dénombrement des <i>Pseudomonas</i> spp. dans les viandes et produits carnés NF V 04-504	51
I.7.2.4.	Mode opératoire pour le dénombrement d' <i>E.coli</i> β NF ISO 16649-2	51
I.7.2.5.	NF ISO 15213: Méthode horizontale pour dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfite –réductrices se développant en conditions anaérobies	52
I.7.2.6.	Mode opératoire pour le dénombrement des Entérocoques	53
I.7.3.	Protocole analytique pour l’obtention des espèces et sérotypes bactériens	55
I.7.4.	Protocole analytique pour l’obtention de la pathogénicité.....	55
I.7.4.1.	Antibiogramme	55
I.7.4.2.	Production de toxines	56
II.	RESULTATS.....	57
II.1.	Description de l’échantillon	57
II.2	Résultat par rapport à la prévalence	59
II.2.1	Prévalence des bactéries recherchées	59
II.2.2	Prévalence des bactéries dénombrées	63
II.3.	Résultat par rapport à l’identification d’espèces	65
II.3.1	Les variétés d’espèces de <i>Vibrios</i>	65
II.3.2	Les variétés d’espèces d’ <i>Aeromonas</i>	69
II.3.3.	Les variétés de <i>Pseudomonas</i>	71
II.3.4.	Les sérotypes de <i>Salmonella</i>	71

II.3.5.	Les variétés d'entérocoques	73
II.4.	Résultat par rapport à la pathogénicité	74
II.4.1	Résultat par rapport à l'antibiorésistance	74
II.4.2.	Résultat par rapport à la production de toxines	79
II.5.	Résultat par rapport à la à la caractérisation d'autres germes	82
II.6.	Récapitulation des résultats par rapport à l'Objectif général	83
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.....		85
CONCLUSION.....		96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		
ANNEXES		

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Composition en protéines, lipides et vitamines de quelques espèces de poissons.....	10
Tableau II : Composition en oligoéléments de quelques espèces de poissons	12
Tableau III : Composants nécessaire pour une réaction PCR correspondant à chaque espèce de <i>Vibrios</i>	28
Tableau IV : Interprétation du résultat d'analyse après MALDI TOF selon score observé	45
Tableau V : Description des échantillons en fonction de l'origine du prélèvement et des espèces de poissons prélevés....	57
Tableau VI : Descriptions des échantillons en fonction de l'espèce de poissons prélevés et leur description	57
Tableau VII : Description des échantillons en fonction de la présentation des prélèvements à la vente	58
Tableau VIII : Description des échantillons en fonction du période de prélèvement	58
Tableau IX : Prévalence en <i>Vibrios</i> , <i>Aeromonas</i> et <i>Pseudomonas</i> des échantillons	59
Tableau X : Prévalence en <i>Vibrios</i> , <i>Aeromonas</i> et <i>Salmonella</i> spp. en fonction de l'espèce du produit	59
Tableau XI : Prévalence en <i>Vibrios</i> , <i>Aeromonas</i> et <i>Salmonella</i> en fonction du période de prélèvement	60

Tableau XII :	Prévalence en <i>Vibrios</i> , <i>Aeromonas</i> et <i>Pseudomonas</i> en fonction de la catégorie du prélèvement	61
Tableau XIII :	Prévalence en <i>Salmonella</i> en fonction de la présentation des échantillons à la vente	61
Tableau XIV :	Prévalence en <i>Salmonella</i> selon la description des échantillons	62
Tableau XV :	Prévalence des germes de dénombrement	63
Tableau XVI:	Prévalence des échantillons présentant un nombre inférieur ou supérieur à la norme pour chaque germe dénombré	64
Tableau XVII :	Espèces de <i>Vibrios</i> trouvées en fonction de l'espèce du produit à analyser	68
Tableau XVIII :	Espèces de <i>Vibrios</i> trouvées en fonction du période de prélèvement	68
Tableau XIX :	Variétés d' <i>Aeromonas</i> prédominant chaque espèce de poissons	70
Tableau XX :	Les sérotypes des souches de <i>Salmonella</i> dans les poissons analysés	70
Tableau XXI :	Résultat de l'antibiogramme sur les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
Tableau XXII :	Résultat de l'antibiogramme sur les souches de <i>Salmonella</i> sp.	74
Tableau XXIII :	Résultat de l'antibiogramme pour les souches d' <i>Aeromonas</i>	75
Tableau XXIV :	Résultat de l'antibiogramme pour les souches d' <i>Aeromonas</i>	76

Tableau XXV : Résultat d'antibiogramme pour une souche <i>d'Enterococcus casseliflavus</i>	77
Tableau XXVI : Résultat d'antibiogramme pour une souche <i>d'Enterococcus faecalis</i>	77
Tableau XXVII : Résultat d'antibiogramme pour une souche <i>d'Enterococcus hirae</i>	78
Tableau XVIII : Résultat des facteurs de pathogénicité des <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	79
Tableau XXIX : Résultat des facteurs de pathogénicité des <i>Vibrio cholerae</i>	80
Tableau XXX : Liste des germes rencontrée lors de l'étude par ordre d'importance en effectif avec leur prévalence et Intervalle de confiance	83

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Origine théorique des poissons	3
Figure 2 : Anatomie externe des poissons	5
Figure 3 : Présentation schématique du <i>V.cholerae</i>	11
Figure 4 : Exemple d'une galerie ApiE avec les résultats des réactions	20
Figure 5 : Schéma illustrant l'appareil et le principe de la MALDI TOF	27
Figure 6 : Electrophorèse : révélation de produits de migration avant et après culture	29
Figure 7 : Présentation de la zone d'étude	31
Figure 8 : Situation du site d'étude	34
Figure 9 : Colonies caractéristiques de Salmonella sur Chromagar Sal+	35
Figure 10 : Colonies caractéristiques d' <i>E.coli</i> béta-glucuronisidase positive sur TBX	50
Figure 11 : Colonies caractéristiques de BSR sur TSC	52
Figure 12 : Colonies caractéristiques des Entérocoques sur BEA	53
Figure 13 : Espèces de <i>Vibrios</i> rencontrées avec leur prévalence	65

Figure 14 : Extrait image PCR illustrant les bandes positives au <i>V.cholerae</i> (300pb)	66
Figure 15: Extrait ‘image PCR illustrant les bandes positives au <i>V.parahaemolyticus</i> (368pb).....	67
Figure 16 : Variétés d’ <i>Aeromonas</i> rencontrées dans les poissons d’eaux douces	69
Figure 17 : Variétés de <i>Pseudomonas</i> rencontrés lors du dénombrement	71
Figure 18 : Variétés d’entérocoques rencontrées dans les poissons d’eaux douces analysés	73
Figure 19 : Image du résultat négatif après PCR Tdh/rh (la bande visible étant le témoin).....	79
Figure 20 : Image du résultat négatif après PCR CtxA/CtxB	80

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de collecte des données

Annexe 2 : Fiche paillasse d'extraction d'ADN bactérien

Annexe 3 : Fiches paillasses des analyses PCR

Annexe 4: Fiches paillasses des sérotypages des Salmonelles

Annexe 5 : Figures des espèces de poissons : Tilapias, Carpes, Cyprin doré et Fibata

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

\leq	:	inférieur ou égal
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
ATP	:	Adénosine Tri phosphate
BEA	:	Bouillon à l'esculine d'azote
BSR	:	Bactérie Sulfito-réductrices
CFC	:	Cétrimide Fucidine Céphaloridine
EPAS	:	Eau peptone alcaline salée
EPT	:	Eau peptonnée
FAO	:	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
LHAE	:	Laboratoire d'Hygiène des aliments et de l'environnement
GN	:	Gélose nutritive
GNS	:	Gélose nutritive salée
MALDI	:	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MKTTN	:	Mueller Kauffman au tétrathionate-novobiocine
NHI	:	Nécrose Hématopoiétique Infectieuse
NPI	:	Nécrose Pancréatique Infectieuse
OIE	:	Office International des Epizooties
OMS	:	Organisation Mondiale pour la Santé
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RVS	:	Rappaport Vassiliadis
TBX	:	Tryptone bile X-glucuronide
TCBS	:	Thiosulfate citrate bile saccharose
TCS	:	Tryptose au sulfite
TDH	:	Hémolysine thermostable directe
TLH	:	Hémolysine thermolabile directe
TIA (C)	:	Toxi-infection alimentaire (Collective)
TOF	:	Time of Flight
XLD	:	Xylose –Lysine - Désoxycholate

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les poissons constituent une source de protéine très intéressante ; selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), ils représentent 17% des apports en protéines dans le monde et jusqu'à 70% dans certains pays côtiers. Sa consommation au niveau mondial a pratiquement doublée en l'espace de cinquante ans soit 19 kilos par an et par habitant pour une production mondiale de 158 millions de tonnes en 2012 (10 millions de tonnes de plus qu'en 2010) [1]. Pourtant, avec une telle consommation (estimée à 20 kg par habitant l'année 2014), l'inspection sanitaire des poissons et produits d'aquaculture a toujours été, et reste jusqu'à présent une minorité pour la plupart des Etats [2]; effectivement, la plupart des responsables politiques et techniques reste convaincus que les poissons présentent peu de risques pour les consommateurs si bien qu'ils préfèrent mobiliser leurs ressources sur d'autres denrées alimentaires. La plus grande intoxication par du poisson que le monde n'ait jamais vécu s'est manifestée en 1988 avec 300.000 personnes ayant contracté l'Hépatite A après ingestion de poissons contaminés [2].

Concernant l'Afrique, le poisson constitue 22% de la ration protéinique en Afrique Subsaharienne, sa transformation et son commerce constituent des sources importantes de revenus pour la plupart des ménages[3]; cependant, seuls la Côte d'Ivoire et le Sénégal atteignent la consommation moyenne mondiale de 17 kg par habitant/an[3]. Particulièrement pour le Kenya, l'Etat a appuyé le secteur de la pêche en engageant 33 inspecteurs avec 20 adjoints destinés spécifiquement pour l'inspection sanitaire des poissons et le suivi qualité de la pêche jusqu'à livraison; il faut toutefois noter qu'il s'agit uniquement des produits destinés pour l'exportation, les produits commercialisés localement restent incontrôlés[2]. Certes, il est rare d'observer de l'inspection sanitaire sur les poissons d'eaux douces consommés localement, or une étude effectuée au Malaisie a montré que la prévalence en *Vibrios spp* dans les poissons d'eaux douces atteignait les 98,67% [4].

Pour Madagascar, et tout particulièrement la ville d'Antananarivo, la consommation en poissons a pris une diminution considérable durant les cinq dernières années selon le Ministère de la Pêche publiée lors d'une revue quotidienne [5]. Les causes en sont diverses mais les principales sont l'érosion des lacs et la propagation

du commerce des poissons venant d'eaux usées selon cette même source. En effet, la plupart des poissons commercialisés en ville proviennent des grands lacs de l'île [6] autrement dit à l'état sauvage; étant donné que la population piscicole de ses lacs n'arrive plus à ravitailler la ville en forte quantité, les commerçants de poissons d'eaux usées commencent à prendre de l'ampleur. Souciant de l'origine incertaine des poissons commercialisés, de plus que l'inspection sanitaire délivrant une certification d'origine et de salubrité n'étant pas en vigueur dans le pays; la plupart des consommateurs décident de ne plus en ravitailler.

Dans les normes internationales (Codex alimentarius), un critère microbiologique est défini comme un critère définissant l'acceptabilité d'un produit, d'un lot de denrées alimentaires ou d'un procédé, sur la base de l'absence, de la présence ou du nombre de micro-organismes, et/ou de la quantité de leurs toxines/métabolites, par unité(s) de masse, volume, surface ou lot . Cependant, aussi bien pour Madagascar que dans plusieurs pays, ces critères ne s'appliquent que pour des produits de mer surtout destinés à l'exportation. Ces contextes ont mené à l'élaboration de la présente étude qui est une première sur les qualités microbiologiques des poissons d'eaux douces à Madagascar. Si presque la plupart des Toxi-infection alimentaire collective (TIAC) déclarées dans l'île proviennent des plats cuisinés à base d'œufs ou de fruits de mer [7], peut on affirmer que les poissons d'eaux douces sont sains, salubres et sans dangers? Outre les contaminations qui peuvent survenir lors de la manipulation des poissons, ces derniers sont aussi sujets à des infections dues à certains germes qui lui sont propres et particulièrement les flores aquatiques dont figurent les *Vibrios*, *Aeromonas* et *Pseudomonas* lesquels peuvent être pathogènes pour l'homme. : Quels sont les caractéristiques de ces bactéries chez nos poissons d'eaux douces?

Partant de l'hypothèse que les poissons d'eaux douces présentent une population microbiologique très importante, l'objectif principal de l'étude est de caractériser les *Vibrios*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* et d'autres germes exigés par les critères sur les poissons d'eaux douces les plus commercialisées auxquels une détermination de la leur prévalence avec les facteurs relatifs, les espèces concernées pour chaque type de germes, leur pathogénicité et l'observation d'autres germes rencontrés.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS

I. ORIGINE, ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DES POISSONS

I.1. Origine et Taxonomie des poissons

Le poisson constitue le plus ancien des vertébrés, son existence parut depuis 400 millions d'année a.vJC (avant Jésus Christ). Selon une étude sur les espèces primitives de la Terre[8], à partir d'un ver marin primitif précambrien dérivait le Haikouichtys il y a 530 million d'années ayant été le plus ancien des vertébrés en Chine et qui a donné par la suite le Pikaia: le plus ancien des ancêtres de poissons en 510 Million d'année aboutissant à l'Arandaspis: le premier poisson au monde.

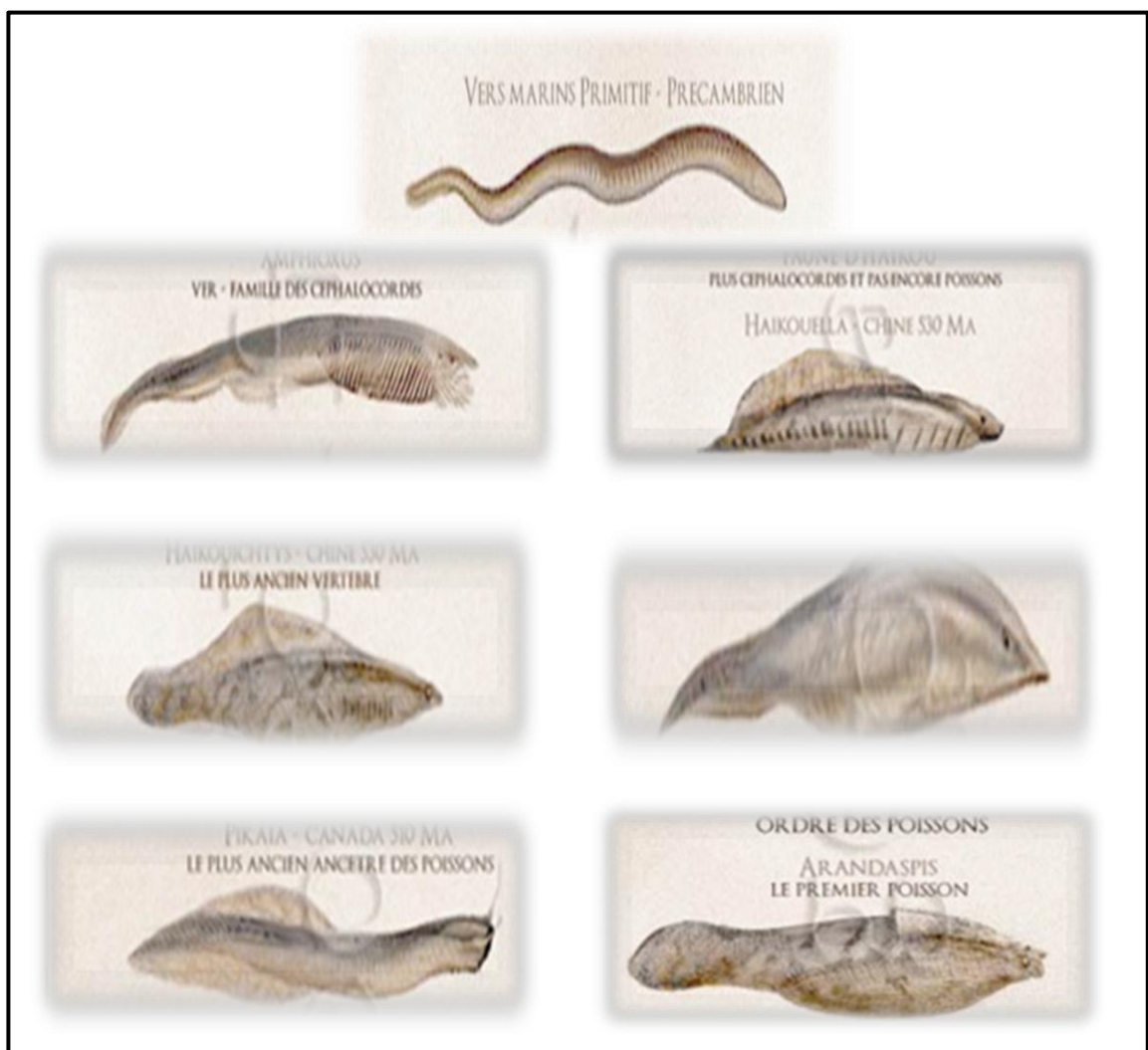


Figure 1: évolution théorique à l'origine des poissons

(Source :Dossin JL. Les espèces primitives de la Terre. GEOPEDIA.2013.[En ligne].
[Consulté le 02 juillet 2016].Consultable à l'URL : <http://www.géopedia.fr/>)

Le poisson est un animal poïcilotherme (ou animal à sang froid) appartenant à l'embranchement des vertébrés dans la superclasse des poissons. Pour les zoologistes, les poissons ne forment pas une classe homogène, mais une superclasse.

Dans la superclasse des poissons, il existe 3 classes pouvant être divisées en deux groupes:

- Groupe des Agnathes : rassemblant les poissons sans mâchoire, elle renferme deux ordres dont O/Myxiniformes et O/Pétromyzontiformes. Leurs caractéristiques sont un squelette fibreux ou cartilagineux, une peau nue avec présence de 7 fentes branchiales et une bouche sous forme de ventouse.
- Groupe des Gnathostomes: réunissant les poissons au sens strict, globalement il s'agit des poissons avec mâchoire.

Les 3 classes sont :

- Chondrichthyens: poissons à squelette cartilagineux plus ou moins calcifiés, leurs paires de nageoires sont articulées sur les ceintures pectorales et pelviennes; généralement, ils possèdent 5 paires de fentes branchiales (parfois 6 ou 7). Cette classe est divisée en 2 sous-classes dont Holocéphale (renfermant l'Ordre des «Chimeriformes» et Sélaciens (composés des Hypotremes dont figurent les raies et Pleurotremes dont les requins en font partie).
- Ostéichthyens: leur squelette interne est en général bien ossifié et soudé à l'os sous-jacent (sur les mâchoires et éléments des arcs branchiaux), les écailles dermiques comportent toujours une couche osseuse[9]. Divisée en deux sous-classes, elle est composée des Crossopterygiens renfermant l'ordre des Coelacantiformes et Actinopterygiens renfermant 3 ordres (Clupéiforme, Siluriforme et Mugiliforme)
- Cyclostomes: squelette en chorde ou arcs cartilagineux, a corps cylindrique ou serpentiforme.

I.2. Anatomie des poissons

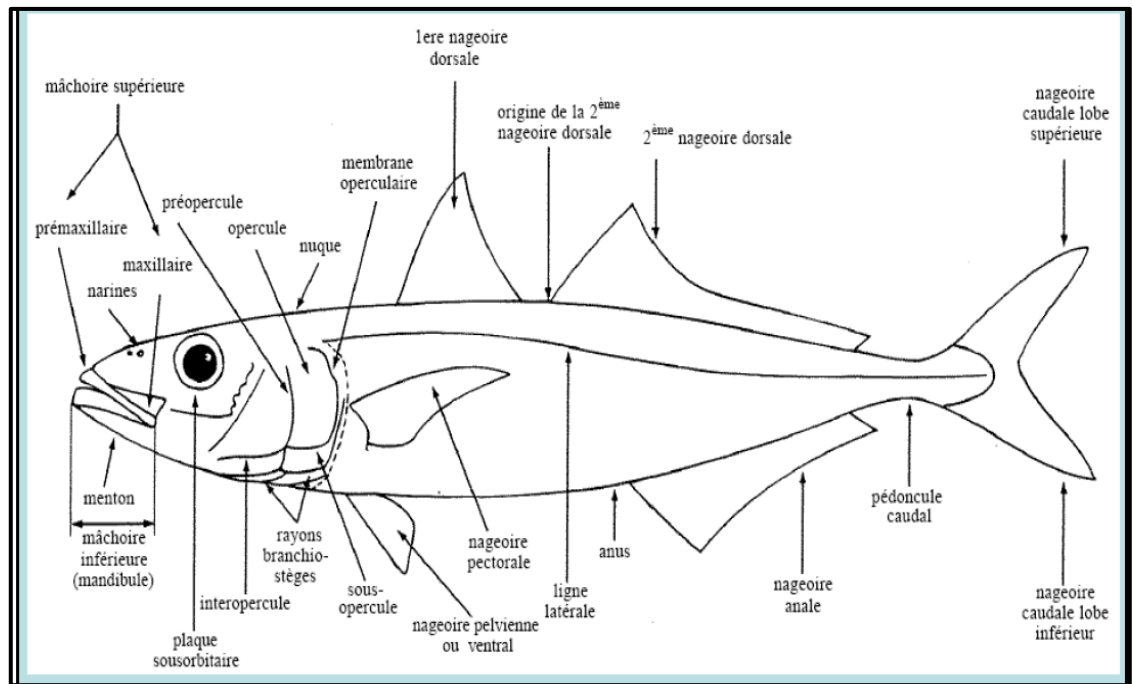


Figure 2 : Anatomie externe des poissons

(Source: Yahyaoui A. **Phylum des chordes (chordata): Systématique des'' poissons''**. Faunistique et Physiologie animale. Faculté des Sciences de Rabat; 2014. p. 75.)

Le poisson est formé de 3 parties:

- La Tête qui part du museau jusqu'au bord postérieur de l'opercule
- Le tronc allant jusqu'à l'anus
- La queue

Les nageoires constituent les membres du poisson lui permettant de se déplacer dans l'eau, il en existe 4 à 5 types:

- Nageoires dorsales et anales: servent d'équilibre pour le corps
- Nageoires caudales: permettent un mouvement de propulsion
- Nageoires ventrales: permettent aux poissons de se stabiliser
- Nageoires pectorales: permettant plusieurs mouvements dont le fait de tourner, fouiner, s'arrêter, s'avancer, monter, descendre et reculer.

Le corps du poisson est recouvert d'écailles en totalité qui sont formées d'anneaux de croissance permettant de déterminer l'âge du poisson. Ces écailles par la suite, sont recouvertes d'un liquide épais appelé «Mucus» ayant pour rôle de protéger le poisson contre le milieu extérieur.

L'anatomie interne des poissons est composée:

- d'un cœur placé derrière l'opercule avec des nerfs,
- de muscles dont le plus développé est celui de la bouche,
- des organes de respiration situés sous l'opercule et appelés « branchies » qui sont des fines lamelles de couleur rouge (remplies de sang)
- vessie natatoire: c'est une bulle remplie d'air placée dans le ventre du poisson lui permettant de remonter à la surface en la gonflant.

Si les mammifères sont reconnus avoir 5 organes de sens, le poisson en possède 6 dont le 6^{ème} est la «*ligne latérale*». La ligne latérale est une série de points régulièrement espacés sur le flanc et reliés au système nerveux: il s'agit de « l'appareil sensoriel du poisson »; elle permet aux poissons de se renseigner sur l'eau ambiante (le courant, la profondeur, la température) et de percevoir les vibrations. Un poisson qui perd la vue réussira à se situer grâce à sa ligne latérale[10].

I.3. Physiologie des poissons

Plusieurs modes de reproduction sont rencontrés chez le poisson en fonction du type de ce dernier: certains sont vivipares, d'autres ovipares et d'autres ovovivipares. La plupart se reproduisent par fécondation externe, la femelle pond ses œufs et le male fécondera ces derniers grâce à sa laitance (équivalent du sperme chez les mammifères). La vie des poissons commence par des stades larvaires tandis que leur mode de vie et d'alimentation sont diversifiés:

- A la ponte, les jeunes alevins possèdent encore une réserve de nourriture appelée « Sac vitellin », après s'en être vidés, ils cherchent eux-mêmes leurs nourritures.
- les larves se nourrissent de zooplanctons (ayant eux-mêmes ingérées du phytoplancton).
- les adultes peuvent être herbivores (pour la minorité) ou des omnivores (détritivores et nécrophages) pour la plupart des cas, mais aussi des carnivores se

nourrissant d'autres poissons ou d'autres chairs pour certains (ex: requins, fibatas).

Certaines espèces dites pélagiques vivent en pleine eau; d'autres dites benthiques, vivent sur le fond [11].

II. Espèces de poissons d'eaux douces

Plus de 30 000 espèces de poissons de pêche très inégale ont été répertoriées dans le monde [11]. Pour Madagascar, concernant les poissons d'eaux douces: sur 46 familles éthiopiennes de poissons, seules 23 s'y retrouvent dans le pays selon Kiener [11]. Aucune famille n'est strictement endémique de l'île; en revanche 8 sur les 49 genres le sont (16%) de même que des 121 espèces (32%). Outre la croissance lente et d'autres contraintes que subissent les espèces autochtones surtout celles endémiques (*Paretroplus polleni* Bleeker ou « *marakely* »), elles font aussi concurrence avec les espèces introduites, qui, depuis leur introduction vers les années 1850 [12] ne cessent de se propager si bien qu'elles se trouvent en voie de disparition actuellement [13].

De 1857 à 1956 [14], l'introduction de poissons dans le pays concernait 20 espèces mais parmi ces dernières, quelques unes se sont principalement acclimatées dont :

- Les Tilapias (surtout *Oreochromis niloticus*)
- Carpes (*Cyprinus carpio*)
- Cyprin doré ou « *trondro gasy* » (*Carassius auratus* L)
- Fibata (*Channa striata* ou *Ophiocephalus striatus*): l'introduction de cette espèce en 1977 est mal connue, elle n'a pas été répertoriée dans la liste officielle pourtant elle prédomine sur les marchés actuellement [15].

II.1. Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Dans presque tous les pays du monde, le Tilapia reste le poisson le plus exploité: l'Asie en produit plus de 80%, la Chine constitue le plus grand producteur et le principal exportateur vers les Etats-Unis avec 900 000T [11]. Originaire du Continent Africain, la production de Tilapia ainsi que des produits d'aquaculture en général y reste limitée.

Le genre *Tilapia* (dans la famille des Cichlidae) a été subdivisé en plusieurs sous-genres, dont trois ont une importance économique :

- sous-genres *Tilapia* qui pondent et incubent sur le substrat et sont herbivores dans la plupart des cas.
- sous-genre *Sarotherodon* qui pondent et pratiquent une incubation buccale effectuée par les deux parents en même temps.
- sous-genre *Oreochromis* : incubation buccale seulement par la femelle

Deux de ces sous-genres sont représentés à Madagascar : le *Tilapia* et l'*Oreochromis* dont 5 espèces les plus répandues : l'*Oreochromis niloticus* Linné (le plus répandu nationalement et au niveau mondial soit 85 à 90% de la production), l'*Oreochromis macrochir* Boulenger, le *Tilapia rendalli* Thys (ex- *T. melanopleura* Dumeril) et le *Tilapia zillii* Gervais.

Le *Tilapia* est un poisson à croissance rapide, facile à nourrir, il peut atteindre la taille marchande de 400g en 8 mois et ne présente pas trop de contrainte d'eau, sa seule contrainte majeure est d'ordre thermique (au minimum 16°C et au maximum 38°C, entre 28°C et 32°C pour les conditions optimum). Sa ferme chair blanche, ses filets roses qui gardent leur couleur même après cuisson en font du *Tilapia* parmi les poissons les plus appréciés dans le monde [11].

II.2. Carpe (*Cyprinus carpio*)

Dans la famille des Cyprinidae, la carpe ou *Cyprinus carpio* Linné a été introduite à Madagascar en 1914. Au départ, c'était la variété dite « miroir » (*specularis* Lacépède) destinée à la pisciculture en étang qui était introduite; dans cette variété, les poissons peuvent atteindre 1m à 20Kg avec un corps trapu, une peau nue contenant 3 séries de grandes écailles situées sur le dos, au ventre et le long de la ligne latérale[16]. Une fois que la variété « miroir » a été déversée dans des eaux libres, les poissons ont pris une régression vers la forme « sauvage ancestrale », un corps plus allongé et entièrement recouvert d'écailles, les tailles les plus rencontrées vont de 20 à 30cm pesant 150 à 300g[13]. La carpe représente l'espèce la plus exploitée à Madagascar derrière le *Tilapia* : soit 20 à 40 % des captures en eaux continentales surtout dans la région du lac Alaotra (où elle est connue sous le nom vernaculaire de « *besisika* »)[6]. La carpe a une croissance moins lente que le tilapia, elle n'atteint la taille marchande qu'à 1 an d'âge en moyenne et présente en outre quelques contraintes d'alimentation et de qualités d'eaux (rassurant toutefois les consommateurs).

II.3. Cyprin doré (*Carassius auratus* Linné)

Le Cyprin doré (*Carassius auratus* Linné), connu sous le nom vernaculaire de « *trondrogasy* » appartient dans la famille des Cyprinidae. Il a été introduit à Madagascar en 1861 par Jean Laborde, sous la forme d'un cadeau pour la reine Ranavalona; depuis, il s'est rapidement éparpillé dans toute l'île de Madagascar [12]. Le cyprin doré présente une livrée (peau) dorée, c'est un omnivore planctophage. Il peut se reproduire plusieurs fois dans l'année et durant la saison chaude mais reste cependant à faible prolificité (on entend par prolificité le nombre d'œufs pondus par une femelle); de ce fait, le cyprin doré ne représente qu'une faible part dans les captures des eaux continentales soit 5 à 10%. Il peut atteindre quelquefois 30 cm pour un poids de 700 g mais les tailles les plus courantes sont de 15 à 25 cm pour 70 à 200 g[6]. Il est souvent retrouvé dans des endroits tranquilles comme les étangs, cours d'eaux ou fosses végétalisées et sa couleur peut varier de l'orange vif typique au vert olive ou blanc crème pour les types sauvages [17].

II.4. Autres poissons d'eaux douces

Etant une espèce introduite clandestinement, le *Fibata* (*Ophiocephalus striatus*) n'était pas destiné pour la consommation au départ mais à des fins mal connues relatives à sa physiologie (il s'agit d'une espèce carnivore qui se nourrit d'autres poissons ou d'autres produits aquatiques). Actuellement, le *Fibata* constitue un produit de commerce chez les vendeurs populaires de Madagascar.

Nombreuses sont encore les espèces de poissons d'eaux douces mais une autre la plus fréquemment rencontrée et consommée dans le monde (mais rare à Madagascar) est la Truite et notamment la Truite Arc-en-ciel qui appartient à la classe des actinoptérygiens, dans l'ordre des Salmoniformes et la famille des *Salmonidae*. Contrairement aux saumons, la truite arc-en-ciel peut se reproduire plusieurs fois au cours de sa vie (pouvant durer jusqu'à 11 années)[18]. La morphologie de la truite arc-en-ciel est très caractéristique des salmonidés: corps allongé, une musculature forte et des nageoires caudales puissantes adaptées à la nage rapide. Outre les types de nageoires que possèdent les poissons, la truite arc-en-ciel possède une nageoire dorsale molle et atrophiée dont le rôle reste encore inconnu.

III. Valeurs nutritionnelles des poissons

III.1. Teneur en protéines, lipides et vitamines

Les teneurs en protéines, lipides et vitamines varient en fonction de l'espèce de poissons concernée, des parties anatomiques analysées et quelquefois de l'âge, du sexe ou des paramètres d'élevage (alimentation, ...) : par exemple, la teneur en lipides de la chair est de 8,4% contre 42,4% dans les viscères chez le tilapia du Nil en élevage avec un aliment riche en protéines, après six mois d'élevage et à un poids moyen de 400 g. Chez la carpe, cette teneur est presque la même au niveau de la carcasse mais trois à quatre fois inférieure au niveau des viscères [11]. Le Tableau I résume quelques valeurs de teneur en protéines, lipides et vitamines chez certaines espèces de poissons

Quelques valeurs pour certaines espèces sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau I: Composition en protéines, lipides et vitamines de quelques espèces de poissons (Valeurs moyennes exprimées pour 100g de muscle frais)

Produits aquatiques	Protéine g	Lipide g	EPA mg	DHA mg	Cholestérol mg	Vit A µg
Thon rouge	23,3	4 à 9	-	-	38	96
Thon jaune	26,1	1	35	131	45	18
Thon blanc	25	11,2	200*	500*	45	
Saumon Atlantique	19,8	8 à 14	1112	2164	52	15
Sardine	197	1 à 18	638	1269	166	8
Truite	20,3	3 à 8	-	-	55	83
Tilapia	17	1-5	-	-	-	-

Tableau I : Composition en protéines, lipides et vitamines de quelques espèces de poissons (suite)

Produits aquatiques	Vit E µg	Vit B1 µg	Vit B2 µg	Vit B6 µg	Vit B 12 µg	Vit D µg
Thon rouge	1	0,24	0,25	0,46	-	5
Thon jaune	0,5	0,43	0,05	0,6	6,8	2,9
Thon blanc	0,9	0,22	0,06	0,4	3	5
Saumon Atlantique	22	0,27	0,14	0,7	3,7	1,1
Sardine	0,3	0,01	0,23	0,68	5,6	10
Truite	1,9	0,2	0,07	0,6	3,8	35

(Source : CIQUAL, USDA, INRA (Nutriment Data Base Standard))

La teneur en protéines peut varier d'une espèce à l'autre; pour près de 400 espèces mesurées, la variation se situe entre 15 à 25g de protéines/100g de chair. La teneur en protéines est constante à l'intérieur d'une même espèce, indépendamment de l'âge, de la saison de capture ou de l'alimentation des poissons. Le profil en acides aminés des protéines de la chair est comparable à celui des viandes tandis que les constituants protéiniques présentent quelques différences: les acides aminés libres et protéines myofibrillaires sont présents respectivement à 70 à 80% (contre 39 à 68% pour les viandes), les protéines insolubles de 3 à 10% (contre 16 à 28% pour les viandes) [19] et la teneur en collagène est jusqu'à 10 fois plus faible que dans la viande de bœuf (à noter que le collagène de la chair de poisson contient deux à trois fois moins d'hydroxyproline, acide aminé à l'origine de la résistance mécanique du tissu conjonctif, ce qui différencie significativement la texture des chairs de poissons des viandes) [20].

III.2. Teneur en oligoéléments

Si le poisson est parfois réputé pour son apport calcique, il contient de nombreux d'autres oligo-éléments nécessaires à la nutrition humaine. Cette teneur varie considérablement en fonction des espèces des poissons mais peut en outre être sous l'influence de plusieurs facteurs. Quelques données en oligo-éléments sur quelques espèces de poissons sont énoncées dans le Tableau II.

Tableau II : Composition en oligoéléments de quelques espèces de poissons

Produits aquatiques	P mg	K mg	Ca mg	Na mg	Cl mg	Mg mg	Fe mg	Se µg	I µg	Zn mg
Thon rouge	254	252	8	39	-	37	0,51		24	0,52
Thon jaune	201	427	8,5	37	-	37,5	0,84	36,5	23,5	53,2
Thon blanc	204	330	8	39	-	23	1,3		24	0,52
Saumon atlantique	207	328	15,2	56	-	21,8	0,36	26,6	24,2	0,57
Sardine	266	360	84,5	110	130	27,5	1,73	51	30,3	1
Truite	273	378	60	40	-	36	0,24	12,6	6	0,7
Tilapia			91	83	-	44	1,1			1,2

(Source : CIQUAL, USDA, INRA (Nutriment Data Base Standard))

IV. Maladies des poissons

Diverses étiologies peuvent être à l'origine des pathologies aquacoles : d'ordre biochimique (accumulation de métaux lourds ou métalloïdes tels que cadmium, plomb,...), présence de contaminants organiques (polychlorobiphényles,

Polybromodiphényl-éthers), accumulation de toxines (mycotoxines, aflatoxines, ochratoxine, cyanobactéries,...) ou histamines mais surtout d'ordre biologique.

La plupart des études sur les maladies des poissons ont montré que des infections bactériennes et infestations parasitaires peuvent être transmises à l'homme tandis qu'aucune zoonose n'a pu être montrée pour les maladies virales jusqu'à présent. Toutefois, outre le risque sanitaire, la maladie des poissons ou d'autres produits de la pêche est toujours importante de point de vue :

- Economique : diminution de la récolte, des stocks
- Organoleptique: altération du goût ou des aspects entraînant une baisse de prix des produits (perte pour les commerçants)

Les pathologies aquacoles peuvent avoir lieu aussi bien dans les conditions naturelles qu'en aquaculture, elles peuvent être accentuées dans les élevages intensifs dues à la forte densité et d'autres conditions non respectées, l'avantage dans ce dernier c'est la facilité de déceler et de contrôler à temps les problèmes du troupeau.

Pour les maladies biologiques, on peut les classer en 3 groupes : les maladies virales, parasitaires et bactériennes : les plus fréquentes et très importantes sont développées ci-après.

IV.1. Maladies virales

Plusieurs maladies d'étiologies virales ont été notées chez les poissons, cinq sont d'apparition aigue tandis qu'une chronique. Les maladies virales les plus fréquentes sont :

IV.1.1 *Maladie du sommeil*

La maladie du sommeil est une maladie des poissons due à un alphavirus de la famille des Togaviridés (virus à ARN), les Truites arc en ciel sont les plus fréquemment atteintes en stade alevin et larvaire. La maladie peut se transmettre aussi bien de façon verticale que de façon horizontale. La plupart du temps, la mort survient sans apparition de signes précurseurs; quelquefois, une baisse de la prise alimentaire ainsi qu'un amaigrissement du lot sont aperçus, mais spécifiquement le fait d'observer des truites couchées sur le flanc au fond des bassins constitue un signe pathognomonique de la

maladie : cette position est due aux nécroses plus ou moins étendues des muscles rouges superficiels. Pour diagnostiquer la maladie, un RT-PCR à partir des 3 tissus cibles (pancréas, cœur et muscle superficiel) est effectué[21].

IV.1.2 Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (NHI)

La Nécrose hématopoïétique infectieuse a pour étiologie un rhabdovirus, elle a entraîné une perte économique grave dans les pays développés. Tous les salmonidés en sont sensibles et la transmission se fait essentiellement par voie horizontale. En phase suraiguë, une mort subite est observée accompagnée de mélanose, distension abdominale, présence de fèces blanc sur l'anus, hémorragies et pétéchies....Il n'existe pas de traitement adéquat, un repeuplement du bassin est conseillé. C'est une maladie à déclaration obligatoire selon l'Office International des épizooties (OIE) [22].

IV.1.3 Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI)

L'agent responsable étant un virus de la famille des birnaviridae, la maladie est cosmopolite et d'impact économique important. Elle se transmet par voie horizontale et verticale provoquant chez les poissons atteints une mort subite sans signes précurseurs accompagnée d'exophtalmie, de mélanose, d'ascite et de pétéchies (les viscères étant pâles après autopsie) sinon si les poissons survivent, ces derniers nagent en spirale ou en tire-bouchon[23].

IV.2 Maladies parasitaires

IV.2.1 Mycoses : *Ichtiophthyriose*

Les mycoses regroupent les maladies qui atteignent la livrée (peau) du poisson et/ou les branchies (branchiomycoses). Ces maladies sont généralement dues à *Ichthyophorus* ou *Ichthyosporidium*.

L'ichtiophthyriose est une mycose due au parasite appelée « *Ichtiophthyrius multifillis* » dont la forme infestante ne survit pas plus de 3 jours. La maladie peut atteindre toute espèce à tout catégorie d'âge et les rescapés peuvent encore s'en ré-infester. Les signes cliniques sont des points blancs au niveau de la peau et des branchies (semblables à la maladie des Points blancs chez les crevettes mais chez ces derniers, l'étiologie est virale) et des signes respiratoires (si les parasites atteignent les

branchies). Pour diagnostiquer la maladie, il suffit de faire un raclage de la peau et/ou des branchies en vue d'un examen microscopique pour l'observation du parasite.

IV.2.2 Myxobolose

La myxobolose est due à un protozoaire appelé « *Myxobolus cerebralis* » affectant le développement et le fonctionnement des organes d'équilibration (oreille interne) des poissons. Il comprime le rachis stimulant le Système Nerveux sympathique et sporule après la mort du poisson. La spore, qui peut survivre 1 an dans l'eau, est par la suite ingérée par un ver appelé « *Tubitex tubitex* », hôte intermédiaire du cycle. Les oiseaux piscivores étant les vecteurs de la maladie, la myxobolose est répandue mondialement, tous les alevins des salmonidés en sont sensibles et les signes cliniques apparaissent sur des poissons de 6 à 7 cm dont une coloration noire sur le 1/3 caudal du corps (très caractéristique de la maladie), une nage en spirale (à cause de l'équilibre perturbée) et des réactions nerveuses anormales dans les 2 et 3 mois après le début de l'infestation; au-delà de cette période, les symptômes nerveuses sont accentuées. Si la mortalité est variable chez les poissons plus vieux, elle est de 100% sur les alevins.

IV.2.3 Tétracapsulose

C'est une maladie due au parasite « *Tetracapsula bryosalmonae* » ; après quelques semaines d'infestation, quelques signes apparaissent telles que léthargie, mélanose, distension abdominale, ascite, exophtalmie, déformation du corps sur la ligne latérale et une anémie ; comme lésions, une splénomégalie et infarctissement du rein sont observés. Il s'agit de l'une des maladies très grave atteignant les salmonidés et dont des bryozoaires peuvent servir de vecteurs, l'infection clinique est discrète chez les vecteurs mais tend vers une réaction hyperplasique chez le poisson en cas très grave ; cependant, il n'existe pas de traitement pratique utilisable [24].

IV.3 Maladies bactériennes

Les *Vibrios*, *Aeromonas* et *Pseudomonas* sont des germes naturels de l'eau; leur présence chez les poissons est presque généralement naturelle et normale ; cependant,

une présence excessive est à l'origine de pathologies à conséquence graves (surtout de point de vue économique) chez ces derniers.

IV.3.1 Les Aéromonoses

Les aéromonoses sont dues aux bactéries du genre *Aeromonas* et *Pseudomonas* sauf *Aeromonas salmonicida*. Ce sont des bactéries gram-, opportunistes dont les plus importantes sont *Aeromonas hydrophila* puis *Aeromonas caviae*. *Aeromonas hydrophila* est susceptible d'infecter toutes les espèces de poissons à différents stades, il s'agit d'une bactérie ubiquiste retrouvée dans toutes les qualités d'eau sauf les eaux trop salines; toutefois, d'autres facteurs favorisant sont à l'origine de la maladie chez les poissons dont les conditions sanitaires défavorables (pollution organique de l'eau, surpopulation, hypoxie), une perturbation de l'équilibre physiologique, des infections ou blessures intercurrentes[25]. La maladie peut se transmettre par voie horizontale et les vecteurs sont l'eau, les poissons morts et malades. Les signes cliniques et lésionnels sont de l'anorexie, de la Mélanose, de l'exophtalmie, de la distension abdominale, des lésions superficielles et profondes de la peau (pourrissement et présence d'ulcères hémorragiques à la base des nageoires et lesquelles peuvent être profondes entraînant une nécrose des muscles sous-jacents). Comme toute infection opportuniste, des mesures d'hygiène sont à entreprendre pour lutter contre les aéromonoses, il faut en outre minimiser le stress et toujours se désinfecter les mains et les blessures car *A. hydrophila* peut surinfecter les plaies cutanées.

IV.3.2 Les Vibrioses :

Les vibrioses chez les poissons sont généralement dues à une bactérie du genre *Vibrio*, notamment le *Vibrio anguillarum* et ses différents sérotypes. La maladie est ubiquiste, essentiellement dans tous les pays ayant une production aquacole marine et atteint essentiellement les salmonidés. La maladie est typique des élevages de grossissement : le stress, la forte biomasse et souvent le manque de déparasitage à ce stade en font les facteurs favorisant. La maladie se transmet par voie horizontale, toutefois la mortalité est faible sauf dans le cas où elle se présente sous forme aigue. Les signes cliniques observés sont les mélanoses, septicémie hémorragique (gueule rouge, hémorragie à la base des nageoires et sur les organes internes), une splénomégalie en forme aigue et

seules des lésions hémorragiques au niveau de la livrée en forme subaiguë. La maladie peut être prévenue en vaccinant par balnéation l'écloserie. Comme traitement, un Antibiogramme peut être établi pour certains sérotypes de *Vibrio* mais pour d'autres, seul le vaccin permet d'en lutter [26]. La pathogénicité des autres *Vibrios* (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, ...) sur les poissons à l'état naturel restent encore à vérifier, les études à ce sujet ont montré des observations limitées. Toutefois, l'homme peut contracter des infections en mangeant des poissons et fruits de mer crus insuffisamment cuits ou en conserves provenant de fonds contaminés [27].

IV.3.3 Furonculose

La furunculose est une maladie également due au genre *Aeromonas* sauf que l'agent responsable est une espèce bien précise : « *Aeromonas salmonicida* ». Cette maladie est spécifique des poissons, si les aéromonoses peuvent contaminer les consommateurs, la furunculose ne montre aucune pathogénicité pour ces derniers. Les signes cliniques chez les poissons sont presque semblables que pour les aéromonoses et particulièrement un développement de cavités remplies de matériel rougeâtre et crémeux dans la peau et le muscle qui n'est autre qu'un mélange de sang, de bactéries, de tissu nécrotique et de cellules inflammatoires [28]. Elle peut être traitée par des antibiotiques.

V. Effet de l'ingestion des poissons contaminés chez les consommateurs

Théoriquement, 4 phénomènes peuvent survenir lors de la relation entre produits contaminés et consommateurs[29]:

- La maladie infectieuse
- La Toxi-infection alimentaire
- L'Intoxication et
- L'Intoxination

V.1. La maladie infectieuse

Une infection est rencontrée lorsque les germes apportées par l'aliment traversent la paroi du tube digestif et se multiplient dans l'organisme. L'incubation est généralement longue (de quelques jours à quelques semaines) et les symptômes sont variables : septicémie, encéphalite, arthrites, avortement, mortinatalité,... mais toujours

accompagnés de fièvre. Plusieurs germes sont à l'origine de ce phénomène telles que la *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Vibrio*,... Ces bactéries se comportent comme des parasites: se nourrissant des nutriments du consommateur, ils provoquent des lésions au niveau du tractus digestif et certaines peuvent même libérer des toxines à tropisme entérique ou neurotoxiques dans leur organisme hôte. D'autres sont invasifs par virulence tels que les *Escherichia coli* entéro-invasifs avec des facteurs d'adhérence (K98); dans ce cas, les risques encourus par le consommateur ne deviennent significatifs qu'à partir d'un niveau de contamination relativement élevé (10^6 /g par exemple) ce qui implique que la norme qualité hygiénique des produits alimentaires contaminés par ces microorganismes est de l'ordre d'une centaine de germes / g ou / ml mais ce dépend évidemment du type de consommateur, de la nature et des conditions de fabrication, de la conservation de l'aliment et de l'espèce microbienne. Une numération est alors réalisée pour évaluer la qualité hygiénique du produit.

V.2.Toxi-infection alimentaire (TIA)

Les micro-organismes ingérés se multiplient dans le tube digestif et secrètent des toxines agissant sur le tube digestif ou sur l'organisme; le consommateur réagissant par rapport à l'absorption du toxique contracte plusieurs symptômes accompagnés de fièvre. L'incubation peut aller de un à plusieurs jours. La présence d'aucun de ces microorganismes n'est acceptable dans les aliments en raison du risque qu'ils font courir aux consommateurs. En conséquence, leur recherche se fait par la méthode présence / absence (ou tout ou rien) et la norme est **“absence dans X g de produit ”**. Parmi les germes à l'origine de TIA, on peut citer nombreuses espèces dont la *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus faecalis*, de nombreuses entérobactéries, etc.

V.3.Intoxication

Il s'agit de l'action des substances chimiques toxiques apparues dans l'aliment par action des bactéries sur les composants de celui-ci telles que l'histamine, putrescine, ptomaïne, cadavérine, polyamines. La durée d'incubation est très courte (0,5 à 1 heure) et les symptômes ne sont pas systémiques pour la plupart.

V.4.Intoxination

L'Intoxination se définit comme l'action de toxines spécifiques de certaines bactéries, produites dans l'aliment (*Cl. botulinum*, *Staphylococcus*) ou libérées par les micro-organismes ingérés sans qu'il n'ait besoin de multiplication (*Cl.perfringens*, *Bacillus cereus*). L'incubation varie de quelques heures à quelques jours avec apparition de symptômes sans fièvre. En général, elle résulte de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*C. botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*). Dans le cas de l'intoxination botulinique, le risque pour la santé du consommateur étant extrêmement élevé, aucune norme ne peut permettre de contrôler l'innocuité du produit. Dans ce cas, adopter des conditions de fabrication - conservation qui garantissent de façon absolue la qualité sanitaire du produit est effectuée.

VI. Pouvoir pathogène des bactéries étudiées

Selon les risques qui peuvent survenir lors de la consommation de produits contaminés énoncés précédemment, chaque bactérie peut en outre provoquer des symptômes qui lui sont spécifiques:

VI.1. Pouvoir pathogène des *Vibrios*

Il s'agit d'une bactérie gram négative oxydase + dans la famille des *Vibrionaceae*. Il existe plusieurs espèces du genre dont les plus pathogènes sont les *Vibrio cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus* et *V.vulnificus*. En fonction des facteurs de pathogénicité que possèdent ces espèces, elles peuvent induire des symptômes graves chez les consommateurs dont les gastro-entérites principalement.

VI.1.1. *Vibrio cholerae*

Les *V.cholerae* sérotypes *O1* et non *O1* sont responsables du choléra, une maladie infectieuse épidémique. En adhérant et colonisant les entérocytes, la contamination et prolifération s'effectuent au niveau de l'intestin grêle. La toxine cholérique provoque une fuite massive d'un fluide riziforme entraînant une déshydratation pouvant être mortelle. Cette toxine, qui est une protéine polymérique de 80 000 daltons de masse moléculaire, est structurée comme dans la figure 3 [30].

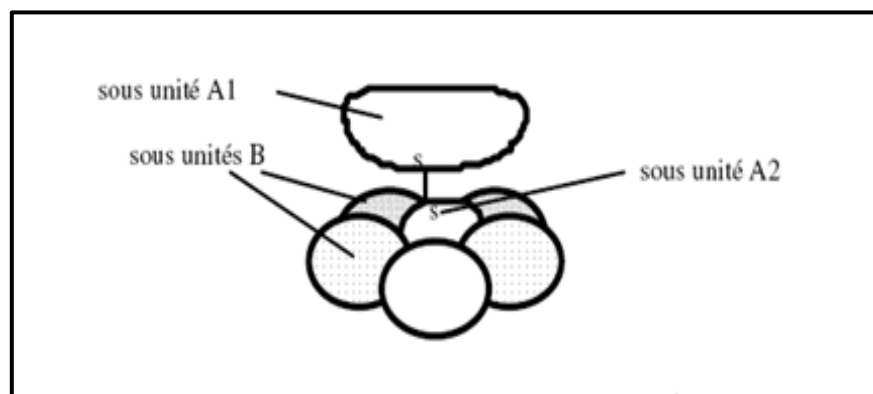


Figure 3 : Présentation schématique du *V.cholerae*

(Source: Cuq JL Microbiologie alimentaire: les relations microorganismes/aliments/consommateurs, les maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments, les agents antimicrobiens. Montnelli: 2007)

La sous-unité A1 aidée par la sous-unité B entre dans la cellule et active l'adénylate cyclase entérocytaire de façon irréversible. Cette enzyme, grâce à l'ATP, produira l'Adénosine monophosphate cyclique intracellulaire modifiant par la suite le métabolisme : une augmentation de la sécrétion d'anions au niveau des cellules de Lieberkhun de la crypte et inhibition de l'absorption du chlore et du sodium au niveau des cellules apicales de la villosité. L'eau accompagnant le transfert de ces ions est excrétée vers la lumière intestinale. L'épidémie de choléra avait pour origine les eaux potables, qui constituent son principal réservoir. Les sérotypes non cholériques peuvent toutefois être à l'origine de gastro-entérites ou de légers maux de ventre.

VI.1.2. Vibrio parahaemolyticus

Le *Vibrio parahaemolyticus* est un vibron marin halophile découvert pour la première fois en 1951 au Japon à la suite d'une toxi-infection résultant de la consommation de sardines semi-séchées[25]. Ce germe est responsable de plus de 50 % des toxi-infections alimentaires dans ce pays. En France, sa présence dans des produits de la mer (crevettes) a été mise en évidence. La maladie se caractérise par une gastro-entérite, des vomissements, des douleurs abdominales, des nausées, de la diarrhée et de la fièvre une douzaine d'heures après l'ingestion du produit alimentaire contaminé, son évolution est la plus souvent favorable après 72heures.

V. parahaemolyticus comprend 63 sérotypes auxquelles seules les souches hémolytiques sont pathogènes (moins de 1 p. 1.000 des souches sauvages). Les réservoirs de l'agent sont :

- l'homme : 0,3 % de la population et 2,5 % des cuisiniers au Japon sont porteurs sains (avec une durée de portage de 3 à 7 jours sans symptômes et 10 à 15 jours après symptômes)
- l'animal : principalement les poissons, mollusques et crustacés (selon l'origine de 0 à 90% des échantillons)
- l'environnement : Eaux de mer et d'estuaires tempérés (Température supérieure à 12-15°C), les planctons et sédiments.

Etant une bactérie résistante, elle est toutefois sensible à la chaleur (dénaturation en 15 minutes à 100°C), le froid est bactéricide en dessous de +7°C et jusqu'à -30°C.

VI.2. Pouvoir pathogène des *Aeromonas*

Il s'agit d'une bactérie gram négative, mobile dans la famille des *Vibrionaceae* dont l'espèce la plus répandue et la plus pathogène est l'*Aeromonas hydrophila*. Certains germes du groupe produisent des hémolysines et/ou cytotoxines; pour *A. hydrophila*, il produit 2 entérotoxines, 2 hémolysines alfa et bêta et 1 cytotoxine. Après un à quelques jours d'incubation, ce germe provoque surtout des symptômes gastro-intestinaux tels que vomissements (rencontrés chez les enfants généralement) et diarrhées liquides dont 25% sont muqueuses et sanguinolentes. Les complications telles que la septicémie, méningite,...ainsi que la mortalité sont toutefois rares. L'*Aeromonas* est un germe hydrique se trouvant dans les eaux douces et eaux de mer sauf les eaux hypersalées (NaCl>5%) et chaudes, par conséquent sa présence dans le tube digestif des poissons est presque toujours systématique ; toutefois d'autres mammifères (ovins, porcins, équins, bovins) peuvent être porteurs dans 10% des cas tandis que 1% pour les humains. *Aeromonas* est rencontré dans presque toutes les denrées cependant elle est facilement maîtrisable : une chaleur au delà de 50°C pendant au moins 2 min suffit à la détériorer tandis qu'une réfrigération à -3°C inhibe sa multiplication.

VI.3. Pouvoir pathogène des *Pseudomonas*

Flore psychotrophe aérobie, le *Pseudomonas* est une bactérie gram négative mobile généralement rencontrée surtout dans les viandes et produits carnés mais peuvent aussi contaminer d'autres produits (les volailles, les poissons, produits végétaux tels que les légumes et les salades et les eaux potables). Les conséquences suite à la contamination par du *Pseudomonas* sont surtout d'ordre organoleptique dont un changement d'aspect et de goût. Pour les caractères superficiels, un poissage puis un limon parfois fluorescent sont rencontrés sur l'aspect (observé surtout chez le poisson), le produit montre une odeur relent et un gout de « viande de frigo » (perte du caractère de produit frais). Sur les caractères profonds, il existe peu de modification de l'aspect mais par contre de l'odeur relent et un gout de métal (oxydé) persistent. Ces signes peuvent apparaître quelques jours à quelques semaines après la contamination. Il faut 10^6 à 10^8 germes par cm^2 selon la nature des surfaces pour provoquer l'odeur tandis que plus de 10^9 germes par cm^2 pour provoquer le poissage – limon. Les principaux réservoirs du germe sont l'homme, les animaux mais surtout l'environnement (germe hydrique). Le germe possède une grande sensibilité à la chaleur (55°C pendant au moins 4mn) toutefois l'odeur et le gout persistent. La contamination à *Pseudomonas* est surtout rencontrée lors de la rupture de chaîne du froid dans les grandes industries. Particulièrement pour *Pseudomonas aeruginosa*, il produit de la pyocyanine lui conférant une pathogénicité à l'origine d'une gastro-entérite grave chez les individus atteints ; en effet, au moins 6 toxines y sont associées : l'entérotoxine, l'exotoxine A, l'exoenzyme S, l'hémolysine, la leucocidine et la glycolipoprotéine. Il est souvent nosocomiale rencontrée lors des surinfections des plaies due à son caractère opportuniste [31].

VI.4. Pouvoir pathogène de *Salmonella* spp.

Selon les recommandations dans les textes en vigueur [32], plusieurs critères microbiologiques sont à satisfaire pour le commerce de poissons : l'absence en *Salmonella* spp pour les critères d'hygiène et un nombre limité en *E.coli*, en Bactéries Sulfite-Réductrices (BSR) et Entérocoques pour les critères de sécurité.

Les *Salmonella* sont des entérobactéries (bacille gram négative) lactose -, H₂S+, généralement présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux. Parmi le genre *Salmonella*, plus de 2500 sérotypes sont actuellement décrits, tous présumés pathogènes pour l'homme. Parmi ces sérotypes, les sérotypes *S.typhi*, *S.paratyphi* A, B et C sont les agents des maladies infectieuses appelées « fièvres typhoïde ou paratyphoïdes »: ces maladies sont toutefois rares, par contre ce sont les toxi-infections dues à *Salmonella* qui sont très fréquentes et dont le sérotype le plus souvent impliqué est « *Salmonella enteritidis* »[33] puis viennent les *S. typhimurium*, *S.heidelberg*, *S.java*, *S.panama*, *S.montevideo*, *S. goldcoast* etc... Les produits alimentaires peuvent être contaminés par des germes du genre *Salmonella* sous plusieurs facteurs :

- soit l'animal même (source du produit) est malade, il s'agit d'une contamination originelle ;
- soit l'aliment a été mis en contact avec un milieu contaminé
- soit que la contamination provient de manipulateurs malades ou porteurs sains du germe.

Les voies de contamination se font par conséquent de façon verticale (directe) et horizontale (indirecte) à la fois. Après une toxi-infection à *Salmonella*, plusieurs signes cliniques variant en fonction de l'espèce, de l'âge et de l'état physiologique du consommateur apparaissent après 5 à 72 h d'incubation; ces signes sont essentiellement constitués de diarrhée, de douleurs abdominales, des frissons, de la fièvre, des vomissements, un état de prostration, une anorexie, une céphalée, des malaises et parfois une entérite. Aux Etats-Unis, 4 à 5 millions de cas de salmonellose par an se traduisant par 2 à 4000 décès ont été enregistrés[30]. Les aliments les plus souvent mis en cause dans les salmonelloses sont les volailles (40%), les viandes et plus particulièrement les viandes hachées (10%), le lait et les produits laitiers (15%), les œufs (5% avec un risque élevé pour ceux de cane ou de caille), les crèmes glacées et pâtisseries (5%), les coquillages etc...Il s'agit de l'un des dangers bactériens les plus graves, toutefois une chaleur à 65°C pendant au moins 1mn suffit à la dénaturer.

VI.5. Pouvoir pathogène des *Escherichia coli*

L'*Escherichia coli* est un hôte normal de l'intestin de l'homme ; dans les fèces, son nombre est voisin de 10^6 - 10^7 par gramme. Il existe plusieurs types d'*E. coli* en fonction de leur site d'action [34]:

- *Escherichia coli* entéropathogènes : ces *E. coli* provoquent des troubles digestifs, notamment les gastro-entérites dans les diarrhées infantiles ainsi que la « diarrhée des voyageurs » (ou Tourista)

Deux types de souches d'*E. coli* entéropathogènes sont actuellement décrits dont les souches entérotoxinogènes capables d'excréter soit une entérotoxine thermostable (fraction ST), soit une entérotoxine thermolabile (fraction LT) et les souches invasives provoquant des diarrhées aiguës, avec fièvre, myalgies et frissons.

- *Escherichia coli* vérotoxinogène: aussi appelé *E. coli* O157:H7, qui étant isolée à partir de nombreux produits alimentaires, provoque une colite hémorragique sévère. Elle a été trouvée dans la viande mal cuite et certains produits laitiers et a fait plusieurs épisodes d'épidémies dans plusieurs pays: Etats-Unis, Canada, Grande Bretagne (où elle a fait une vingtaine de cas dont certains mortels).

Les milieux d'isolement de ces bactéries font aujourd'hui appel à la mise en évidence simultanée d'activités enzymatiques (bêta-D glucuronidase et bêta-D galactosidase) à partir de substrats adaptés libérant au cours de leur hydrolyse un composé chromogène : *E. coli* possède à 44°C ces deux activités. Les *Escherichia coli* sont des germes résistants, toutefois cette résistance est moindre que celle des *Salmonelles*. Pour O:157 H:7, considérée comme une des plus résistantes, la dénaturation est obtenue à 70°C pendant au moins 70 mn.

Les autres germes: *Bactéries sulfito-réductrices* et *Entérocoques* sont importants du point de vue qu'ils témoignent la présence d'une contamination fécale.

VII. Méthode d'analyse des bactéries

VII.1 Terminologie

Bactérie : microorganisme vivant unicellulaire, le plus souvent dépourvu de chlorophylle, résistant selon son espèce à une chaleur inférieure à 100 ou 1200, visible seulement au microscope, se reproduisant par scissiparité et dont les deux principales formes sont les microcoques et bacilles [35]. Son génome est constitué d'ADN consistant en un seul chromosome et avec présence de plasmides ; toutes les bactéries ne sont pas obligatoirement pathogènes, d'autres sont même nécessaires pour l'homme.

Dénombrement bactérien [36]: certaines bactéries ne sont pathogènes que si elles sont présentes de façon excessive ; la méthode adaptée pour les analyser est de les compter à partir d'un échantillon dilué plusieurs fois et de ramener ensuite par calcul le nombre de germe/g de produit. Comparé au nombre maximal de germes tolérables en fonction du produit (indiqué dans les normes), la présence de la dite germe dans le produit est jugé « satisfaisant » ou « non satisfaisant ». La dilution est effectuée et considérée jusqu'à ce qu'on aboutisse à de colonies mesurables (comptables) ainsi la formule de présentation des résultats tient compte du nombre de dilutions ainsi que de la prise d'essai. Généralement, le mode de calcul se situe comme suit:

$$N = (\sum SM + d_n / 1,1) \times 10^n$$

N= nombre de germe dans le produit (ufc/g)
 $\sum SM + d_n$ = somme des nombres de colonies comptées dans
chaque dilution (ne retenir que les chiffres dénombrables)
10= correspond à la dilution du produit à l'origine de
la prise d'essai
n = niveau de dilution la plus basse renfermant
des colonies comptables

Prise d'essai : La prise d'essai est un échantillon représentatif mesuré (volume ou masse) prélevé sur l'échantillon pour servir à la préparation de la suspension mère.

Suspension mère : La suspension mère ou première dilution est une émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser a été mélangée avec une quantité de diluant égale à neuf fois cette quantité de produit.

Milieux de culture : il s'agit d'une préparation permettant la repousse de bactéries afin de les identifier, d'étudier leurs caractères ou de les conserver [37]. Afin de nourrir les bactéries, ils doivent satisfaire des exigences nutritives. Le milieu de culture peut être sélectif (ne peut faire pousser que certaines germes qui lui sont spécifiques) ou non sélectif (capable de faire pousser plusieurs germes à la fois). Il peut être liquide (bouillon) soit solide (gélose).

VII.2 Culture bactérienne

A chaque bactérie et chaque produit correspond des méthodes d'analyse bactériologiques adéquates lesquelles sont déjà énoncées dans les critères. Ces méthodes sont de façon générale, soit une « Recherche » soit un « Dénombrement » ; pour les deux cas, il faut toujours partir d'une culture bactérienne. Les grandes étapes d'une culture bactérienne consistent en :

- un pré-enrichissement : il se fait généralement dans un Bouillon Nutritif afin de faire proliférer les germes dans le produit, c'est l'échantillon du produit (prise d'essai) qui est pré-enrichi.
- un enrichissement : un échantillon du pré-enrichissement estensemencé su boite à milieu sélectif ou non pour que les bactéries puissent se multiplier.
- un isolement : parmi la multitude de colonies qui peuvent pousser sur la boite, repiquer celles qui semblent être caractéristiques du germe recherché puis les refaire pousser en vue d'une confirmation.
- une confirmation

Toutes ces étapes sont toutes intercalées d'une incubation. Pour les trois premières étapes, les matériels ainsi que les procédés sont presque pareils pour toutes les laboratoires c'est à dire utilisation de milieux de culture, des boites de pétri, ensemencement sous flamme (dans un environnement stérile),... mais au niveau de la dernière étape, chaque laboratoire peut adopter sa propre méthodologie. Parmi les méthodes de confirmation utilisées en bactériologie, on peut citer les «Test biochimiques», la Technique MALDI-TOF et le PCR.

VII.2.1 Tests biochimiques

Après isolement, les colonies peuvent déjà être identifiées par leurs caractères morphologiques : aspect, couleur, texture, taille,... Cependant, plusieurs germes peuvent avoir les mêmes caractères morphologiques c'est pourquoi quelques colonies caractéristiques sont testées avec divers produits biochimiques (oxydase, mannitol, glucides fermentaires,...) et dont les réactions sont notées puis comparées à une grille préétablie propre à chaque bactérie. Ces analyses biochimiques peuvent être effectuées une à une soit en utilisant les techniques phénotypiques incluses dans une seule galerie correspondant à chaque famille de bactérie (exemple : Galerie ApiE, ApiNE, galerie Mérieux, ...).



Figure 4 : Exemple d'une galerie ApiE avec les résultats des réactions

(Source : Carlier V. Analyse et maîtrise des risques dans les industries agroalimentaires: Fiches dangers microbiologiques 2010)

VII.2.2 Technique MALDI-TOF

La MALDI TOF ou Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight est une technique d'identification bactérienne par spectrophotométrie de masse. La spectrométrie de masse permet l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques et peut permettre l'identification des micro-organismes grâce à l'analyse de leur contenu protéique. La source d'énergie étant un faisceau laser pulsé émettant dans le domaine des ultraviolets, les ions générés à partir d'une colonie (fraiche) étalée très finement sur la cible sont séparés en fonction de leur temps de vol (TOF). Chaque groupe d'ions permet d'enregistrer un signal au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité ; l'ensemble des pics enregistrés constitue ainsi un spectre de masse [38]. Les nombreux pics produits correspondent à des protéines ribosomales principalement et semblent spécifiques d'espèce mais peu influencées par les variations intra spécifiques[39].

Les spectres obtenus à partir de bactéries entières sont ensuite comparés aux spectres de référence présents dans la base de données d'un système expert (cette base de données dépend du laboratoire car c'est ce dernier qui élabore sa propre base en fonction de ses besoins mais dans tous les cas les spectres de référence ont été obtenus à partir des souches types et d'isolats cliniques issus de collections internationales).

L'authenticité des résultats obtenus après Maldi ToF dépend toutefois de quelques conditions : la concordance d'un spectre obtenu à partir d'une bactérie étudiée avec celle des souches de référence est traduite par un score qui indique le degré de confiance à accorder à l'identification. Le Tableau III montre la méthode d'interprétation d'un résultat au MALDI TOF.

Tableau III : Interprétation du résultat d'analyse après MALDI TOF selon score observé

Score	Description	Symbole
2.300 – 3.000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++
2.000 – 2.299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++
1.700 – 1.999	Identification au genre probable	+
0.000 – 1.699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-

La Technique MALDI TOF a été une solution bénéfique pour la plupart des laboratoires dans le monde, quelques minutes à peine suffisent pour identifier plusieurs bactéries à la fois; elle a pu remplacer les identifications biochimiques, les techniques phénotypiques (galerie API, Mérieux, etc...) qui sont à la fois longues et onéreuses. Toutefois, les résultats ambigus à cette identification requièrent encore une autre méthode de confirmation telle que PCR, ...

Les matériels nécessaires pour une identification par MALDI TOF sont :

- Une culture fraîche des bactéries à identifier
- Une Cible ou « Target » : plaque où on étale très finement les colonies, dépendant du type, la plaque peut contenir 96 cibles ou plus permettant ainsi d'identifier en même temps 96 colonies différentes (la plupart, pour mieux interpréter une colonie, elle est mise en duplicate ou triplicate)
- L'appareil proprement dit qui va permettre la lecture de chaque cible est rattaché à un ordinateur qui va traiter les dossiers d'analyses affichant le résultat avec les interprétations ou degré de confiance et commentaires correspondantes.

L'appareil et le principe de la MALDI TOF est schématisé dans la Fig.9.

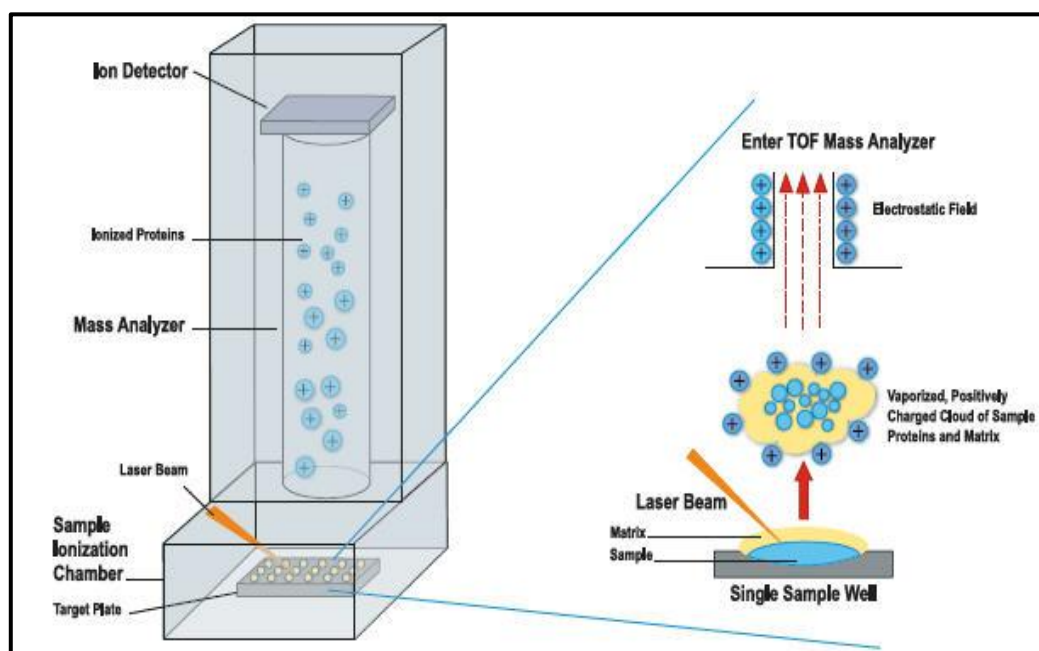


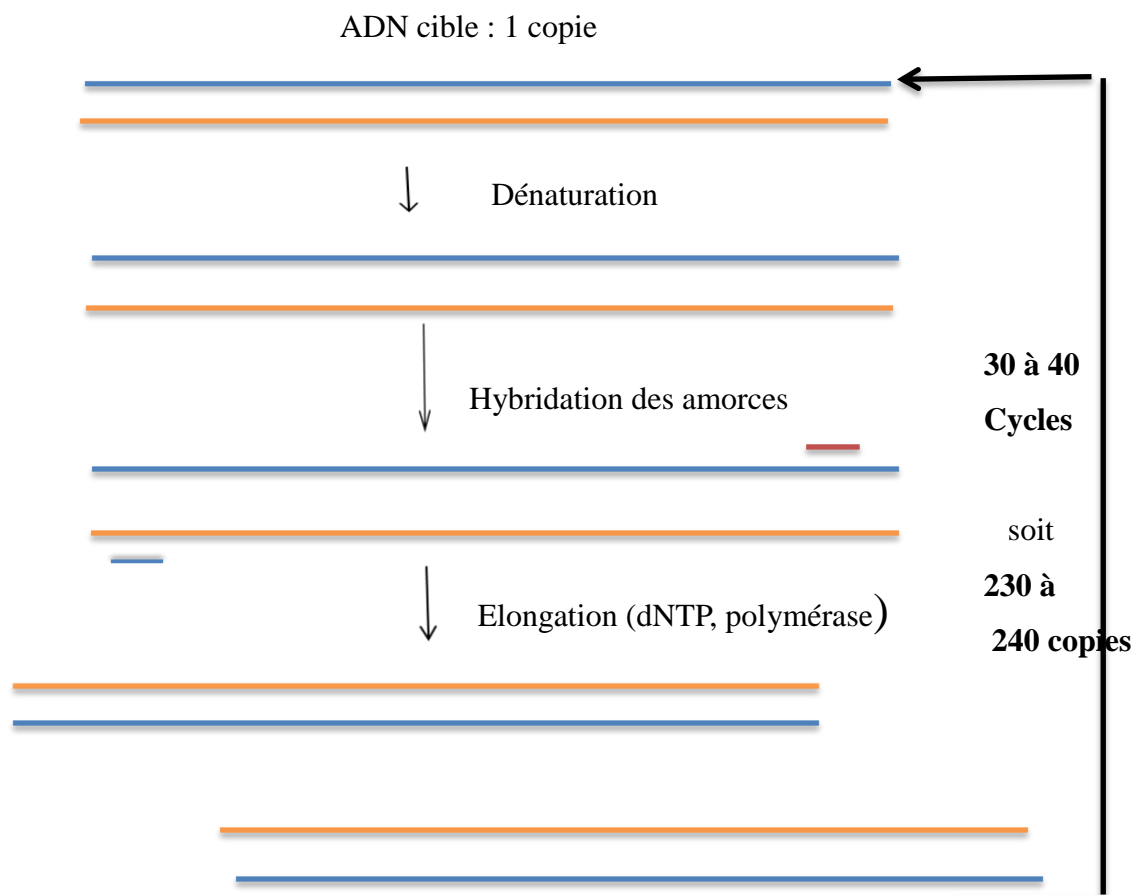
Figure 5 : Schéma illustrant l'appareil et le principe de la MALDI TOF (Source: Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. Identification bactérienne de routine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Lille : impact médical et économique. Anses: Agence nationale de la sécurité sanitaire 2011)

VII.2.3 Technique PCR

La PCR ou Polymérase Chain Reaction est une science technologique développée par Kary Mullis en 1987 [40], permettant de trouver la séquence génomique ou la taille d'un fragment d'ADN cible. Le principe de la PCR est d'établir plusieurs copies de l'ADN cible afin de mieux les observer. Grace aux propriétés de l'ADN même, les étapes d'une réaction PCR consiste en une :

- dénaturation : à une certaine température, les brins d'ADN sont susceptibles de se dénaturer donc de se séparer
- Hybridation des amorces : grâce à l'enzyme polymérase, les ADN peuvent reconstituer les nucléotides complémentaires à l'ADN cible s'il existe un site d'initiation appelé « Amorce » ou « Primers »
- l'élongation : étape aboutissant à la copie de l'ADN de départ

De façon simplifiée, les principes de la PCR peut être représentée comme suit [41]:



La succession de ces étapes constituent une réaction PCR, le nombre de cycles dépend de la quantité d'ADN que l'on veut obtenir à la fin, cette quantité est mesurée par la formule suivante :

$$\text{Quantité ADN} = 2^N \quad \text{avec } N = \text{nombre de cycles}$$

En général, il existe deux types de PCR : le PCR conventionnel ou classique et le PCR à temps réel (amplification basé sur la fluorescence). Les réactifs nécessaires pour chaque réaction PCR sont : l'amorce ou Primer (site d'initiation variable en fonction du fragment qu'on veut obtenir, elle est rajoutée d'une sonde, enzyme qui constitue l'élément majeur permettant la copie, cations métalliques servant de cofacteurs de l'enzyme, dNTPs comme charpente, une matrice, des tampons et sels.

Pour amplifier un ADN, il faut d'abord arriver à l'extraire ce qui constitue le produit de base c'est-à-dire l'échantillon à analyser. Selon le produit de départ (tissu ou souche bactérienne), les étapes pour l'extraction d'ADN montrent quelques différences ; dans tous les cas, le principe consiste en une lyse cellulaire et récupération du substrat (eluât d'ADN) qui sera conservé pour l'analyse PCR voulu. Ainsi, la réaction PCR permet d'observer si cet extrait d'ADN contient un fragment prédéterminé (initié par l'amorce). Après une réaction PCR (par l'appareil « Biométra »), l'interprétation se poursuit par une électrophorèse où les contenus protéiniques des produits PCR (déposés dans du gel d'agarose) migrent vers la paire de base correspondant à leur poids moléculaire. Les produits migrés vont ensuite être émis dans de l'appareil spécifique afin de capturer l'image à interpréter.

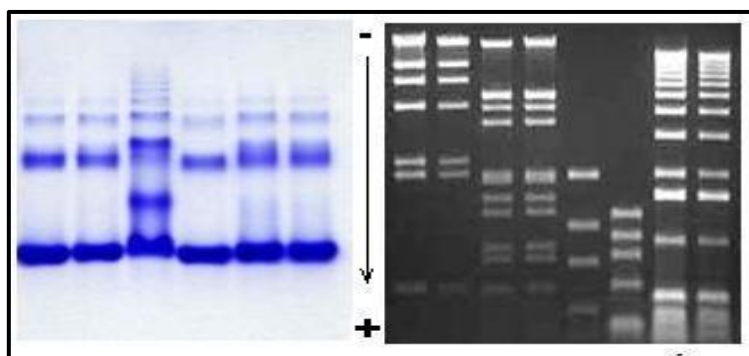


Figure 6 : Electrophorèse : produits de migration avant et après capture

(Source : Descours G. Diagnostic des infections bactériennes: quelle place pour la biologie moléculaire? 2014.)

VII.5. VII.3. Pathogénicité bactérienne

La présence d'une bactérie dans un produit donné ne suffit pas à déduire sur le danger issu suite à la consommation du produit. En effet, chaque bactérie possède ses structures ou caractères à l'origine de leur pathogénicité. Généralement, on peut citer la résistance aux antibiotiques et la production de toxines ou d'autres facteurs de virulence.

VII .3.1. Antibiorésistance

Théoriquement, un antibiogramme a pour objectif d'observer la sensibilité ou la résistance d'un antibiotique face à un germe et le réciproque de point de vue thérapeutique (sensibilité ou résistance d'un germe face à un antibiotique). Le paramètre à exploiter lors d'un antibiogramme est surtout la Zone d'inhibition; le diamètre de cette zone d'inhibition renseigne jusqu'à quelle distance l'antibiotique est capable d'inhiber la multiplication de la souche mise en culture. Généralement, plus ce diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus on a une sensibilité et dans le cas inverse, une résistance; toutefois l'interprétation du diamètre dépend elle-même de la souche en question. Une bactérie qui possède une résistance à plusieurs antibiotiques est difficile à combattre.

Exemple : Pour la gentamicine, un diamètre 17mm \geq est considéré sensible pour les Entérobactéries alors qu'il l'est à 15mm pour Pseudomonas.

VII.3.2. Production de toxines ou d'autres facteurs de virulences

Suivant le type et structure de la bactérie, certaines produisent des toxines, d'autres sont pathogènes grâce à leur multiplication excessive et d'autres grâce à leurs structures mêmes c'est-à-dire la possession des protéines pathogènes.

*Exemple : l'*A.hydrophila* pathogène possède diverses sortes de cytotoxines, de l'Antigène capsulaire K et d'autres facteurs lui afférant sa pathogénicité.*

Ces facteurs de pathogénicité ne sont détectables que lors d'utilisation de matériels performants tels que PCR, ...

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. METHODES

I.1Présentation de la zone d'étude

La présente étude a été effectuée dans la Commune Urbaine d'Antananarivo, une des 134 communes et de la Région Analamanga. Avec une superficie de 107 Km², la Commune Urbaine d'Antananarivo est divisée en six arrondissements dont [42]:

- I^{er} arrondissement : centré à Analakely où vivent 21% de la population Tananarivienne.
- II^{ème} arrondissement : composé de 24 quartiers aux alentours d'Ankatso-Ambolonkandrina.
- III^{ème} arrondissement : où vivent 12% de la population répartie en 34 quartiers et centré à Antaninandro.
- IV^{ème} arrondissement : aux alentours de Mahamasina occupant 17% de la population.
- V^{ème} arrondissement : composé par 27 quartiers et abritent 27% de la population.
- VI^{ème} arrondissement : où vivent 10% de la population qui est répartie dans 31 quartiers aux alentours d'Andraharo.

Avec plusieurs milliers de population recensée, la Commune Urbaine d'Antananarivo est la plus vaste et la plus importante en termes en densité de population. Une population estimée à 2millions d'habitants pour la totalité de la ville a consommé plus de 8tonnes de produits d'eaux douces en 2011 [6] .

En plus des activités agricoles, rizicoles et avicoles de la Région Analamanga, la pisciculture, bien qu'elle reste non professionnalisée occupe aussi une place assez considérable. Il est noté que la région possède 13 lacs (Ikopa, Sisaony, ...), 74 Ha d'étangs [42] dont les produits sont exclusivement commercialisés dans la Commune Urbaine d'Antananarivo, outre ceux issus des lacs nationaux.

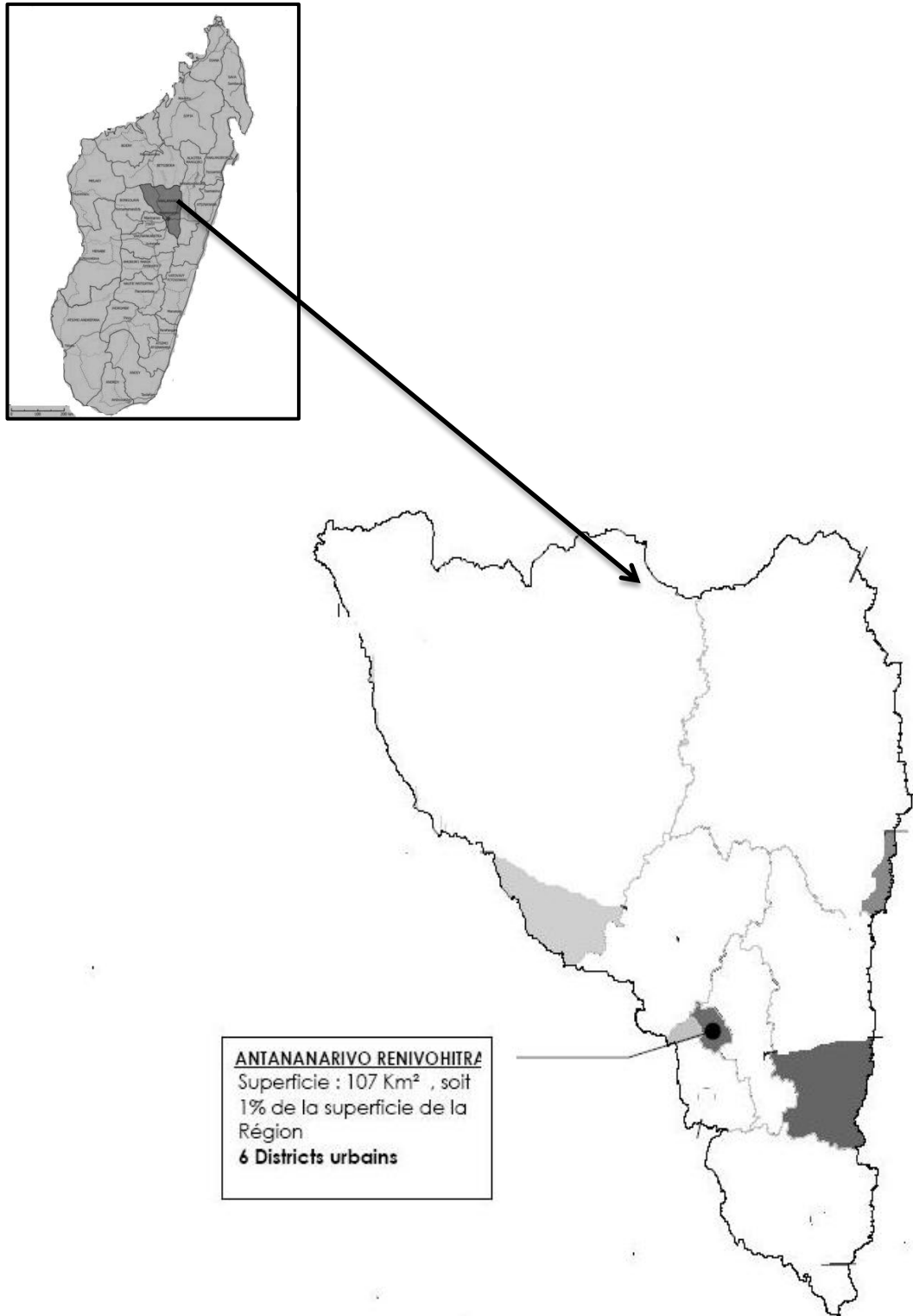


Figure 7 : Présentation de la zone d'étude

(Source : Données sur les régions de Madagascar adaptées par l'auteur)

Les prélèvements issus des arrondissements de la zone d'étude sont exclusivement traités à l'Institut Pasteur de Madagascar, site auquel se déroule la totalité de l'étude.

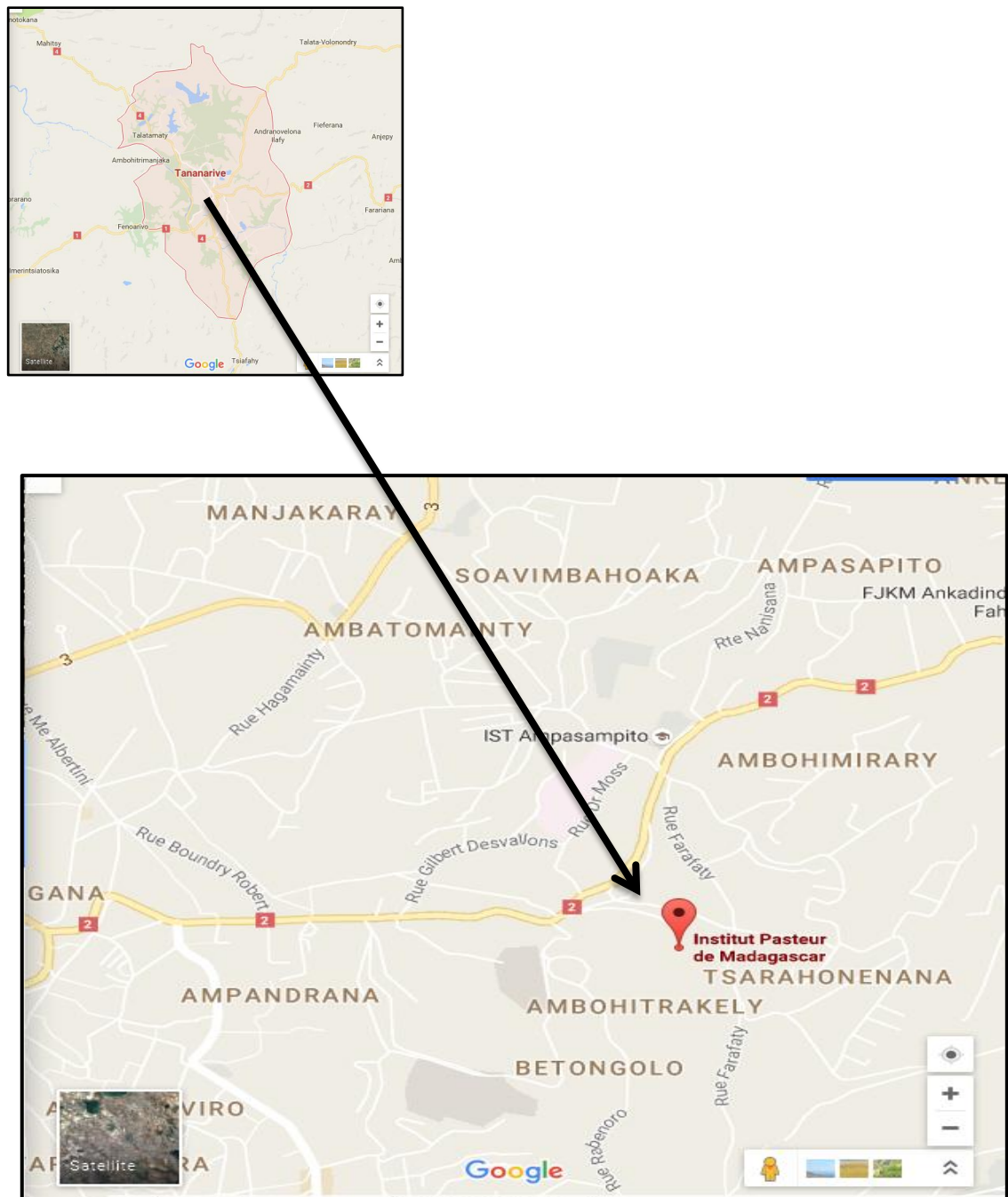


Figure 8 : Situation du site d'étude

(source : Source : Google ; [en ligne].Données cartographiques 2016 consultable à l'URL <https://www.google.fr/maps/commune> urbaine d'Antananarivo)

I.2 Type d'étude

Il s'agit d'une étude transversale, descriptive, de prévalence et par échantillonnage.

I.3 Période d'étude et durée de l'étude

Pour une durée d'étude de 12 mois, la période d'analyse s'est tenue du 01 Septembre 2015 au 29 Février 2016 incluant une saison d'ouverture et clôture de la pêche.

I.4 Population d'étude

La présente étude visant à caractériser les *Vibrios*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* et germes exigés par les critères sur des poissons d'eaux douces commercialisés dans la ville d'Antananarivo; la population d'étude est, par conséquent, constituée de poissons d'eaux douces les plus commercialisés[6] dont :

- les Tilapias (*Oreochromis niloticus*)
- Carpes (*Cyprinus carpio*).
- Dans les cas où on n'observe pas l'une des deux espèces sur les marchés, on prélève soit le Fibata (*Ophiocephalus striatus*) soit le Cyprin doré (*Carrassius auratus* Linné).

I.4.1 Unité d'analyse

Comme il est décrit précédemment, l'étude est axée sur les poissons d'eaux douces.

I.4.1.1 Critères d'inclusion

Sont inclus les poissons de moyenne ou grande taille (pesant dans les environs de 100g) étant donné que c'est la chair qui sera utilisée pour l'analyse bactériologique (contrainte de manipulation opératoire).

I.4.1.2 Critères d'exclusion

Sont exclus les poissons qui montrent des signes d'altération à la vente lesquels fausseraient les résultats obtenus.

I.4.1.3 Taille et Mode d'échantillonnage

Puisqu' on cherche à caractériser les germes sur poissons d'eaux douces, la taille d'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$N = t^2 \times p (1-p) / e^2$$

Avec :

- N= taille d'échantillon
- t= niveau de confiance déduit du taux de confiance = 1,96 pour un taux de confiance de 95%.
- p = prévalence de contaminations des poissons

Selon une étude effectuée sur des poissons d'eaux douces au Malaisie, la prévalence en *Vibrios spp* est de 98,67 % [4]ce qui donne la valeur de p.

- e = marge d'erreur = 5%.

En effectuant le calcul, la valeur de N est :

$$N = (1.96)^2 \times 98,67\% (1 - 98,67\%) / (5\%)^2 = 20 \text{ échantillons}$$

Etant donné qu'il s'agit d'une étude de prévalence, l'analyse est effectuée sur 20 échantillons avec 3 prélèvements successifs répétés sur les mêmes lieux de collecte ainsi au final **60 échantillons** sont analysés.

En accordant les contraintes sur terrain et les sites d'élevage éligibles, au total 59 échantillons ont été prélevés.

Les poissons à prélever sont achetés sur les marchés ; par conséquent, le mode de leur échantillonnage ne dépend pas du préleveur mais selon ce qu'établit le commerçant du moment que les produits satisfont les critères d'inclusion.

Il est à remarquer toutefois qu'un échantillon peut comporter 2 à 3 unités de poissons ou quelques morceaux de poissons comme il est présenté à l'étalage.

I.4.2 Unité d'échantillonnage

Afin de comparer les études en des sources différentes, l'échantillonnage est axé sur 3 catégories de lieux de collecte :

- Catégorie I : regroupant les poissons issus d'élevage, l'Unité d'Échantillonnage concerne dans ce cas des élevages piscicoles.
- Catégorie II : poissons qui sont probablement issus des grands lacs de Madagascar (Lac Alaotra, Lac Itasy, Lac Miandrivazo, Mantasoa,) dont l'origine est fournie par le vendeur. L'Unité d'Échantillonnage regroupe les poissonneries ou marchés certifiées, grossistes, supermarchés,...
- Catégorie III : poissons issus des marchés populaires à forte fréquentation de la ville et sans contraintes d'origine (l'Unité d'Échantillonnage regroupe les marchés populaires).

I.4.2.1 Critères d'inclusion

- Catégorie I : sont inclus les pisciculteurs de la ville et périphérie, élevant en même temps des tilapias et carpes, qui font l'élevage d'engraissement (ou de grossissement) dont les produits sont mis en vente dans la ville d'Antananarivo.
- Catégorie II : sont inclus les points de vente (supermarché, marché ou grossiste ou poissonneries fixes certifiés dont la liste a été obtenue au Ministère de la pêche).
- Catégorie III : sont inclus les marchés populaires (à forte fréquentation de la ville) : Andravoahangy, Analakely, Anosibe,...etc

I.4.2.2 Critères d'exclusion

- Catégorie I : absence de critères d'exclusion
- Catégorie II : sont exclus ceux qui ne révèlent pas la source de leurs produits.
- Catégorie III : sont exclus les marchés ambulants.

I.4.2.3 Taille et Mode d'échantillonnage

En fixant que l'analyse proprement dite a été effectuée pendant 3 mois (1 prélèvement par mois ou toutes les 3 semaines), 20 échantillons sont traités pour un prélèvement incluant les deux espèces.

Un prélèvement étant issu de 3 catégories d'endroits différents (cf unité d'échantillonnage), les 10 échantillons seront répartis en 3 pour aboutir au taille de l'unité d'échantillonnage par catégorie $\longrightarrow 10/3 = 3 \text{ à } 4 \text{ points de vente / catégorie d'Unité d'Echantillonnage}$. Les mêmes points de vente sont repris pour chaque prélèvement.

A partir des bases de données concernant les pisciculteurs ainsi que les poissonneries certifiés en ville provenant de la Direction des Ressources halieutiques et recensement des marchés populaires à forte fréquentation, l'échantillonnage est effectué de manière aléatoire simple et en considérant les arrondissements de la cadre d'étude.

Pour les contraintes de terrain, les catégories qui n'atteignent pas la taille voulue, leurs échantillons manquants ont été rapporté dans la catégorie incluant plusieurs unités d'échantillonnage possibles.

I.5 Paramètres étudiés

Les paramètres étudiés lors de cette étude sont :

- la Prévalence
- l'identification d'espèces ou de sérotypes bactériens
- La pathogénicité : l'Antibioresistance et autres facteurs de pathogénicité

I.5.1 Prévalence

La prévalence est un outil statistique pour la mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné; par calcul, il s'agit du rapport entre le nombre de personnes atteintes d'une maladie à un moment donné sur le nombre de population à risque. Pour le cas de la présente étude, l'objectif est de déterminer le taux de contamination en *Vibrios*, *Pseudomonas* et *Aeromonas* des poissons commercialisés en ville ainsi le calcul renseignera sur l'aspect que parmi les poissons commercialisés, combien sont contaminés en chacun des germes à chercher.

Prévalence *Vibrios* = Nombre de poissons contaminés en *vibrios* /
Nombre de poissons analysés

Prévalence *Aeromonas* = Nombre de poissons contaminés en *Aeromonas* /
Nombre de poissons analysés

Prévalence *Pseudomonas* = Nombre de poissons contaminés en *Pseudomonas* /
Nombre de poissons analysés.

Prévalence *E.coli* = Nombre d'*E.coli* dépassant la norme / Nombre de
poissons analysés (même formule pour les BSR et les entérocoques)

Prévalence *Salmonella* = Nombre de poissons contaminés en *Salmonella* /
Nombre de poissons analysés

I.5.2 Recherche d'espèces bactériennes et Sérotypage

Si un genre bactérien est reconnu pathogène, tous ces sérotypes ne le sont pas forcément par conséquent obtenir un résultat positif après recherche d'une bactérie ne suffit pas à conclure sur sa pathogénicité, le sérotypage, l'identification d'espèces par divers moyens (confirmation biochimique, Maldi tof ou PCR) doivent être établis en vue de conclure la pathogénicité éventuelle. La prévalence de chaque espèce trouvée est calculée de la mode suivante :

Prévalence sérotypes/espèces = effectif de chaque espèce ou sérotype / nombre total des
contaminés au genre correspondant à l'espèce ou sérotype

Exemple : Prévalence en *V.parahaemolyticus*= Nombre de *V.parahaemolyticus* /
Nombre de *Vibrios* trouvés au total.

I.5.3 Pathogénicité

I.5.3.1 Antibiorésistance

Chaque germe confirmé est testé à plusieurs antibiotiques préalablement listé en fonction de chaque bactérie et dont les caractères « Résistant » seront pris en considération c'est-à-dire évaluer parmi un effectif d'espèces bactériennes, combien ont montré une résistance à un antibiotique donné ?

I.5.3.2 Production de toxines

Les *Vibrios* possèdent plusieurs sérotypes dont seuls sont pathogènes ceux qui sont hémolytiques à cause de leur production de toxines. Pour chaque toxine considérée, une absence ou présence dans un échantillon est à conclure après recherche. En combinant tous les résultats, la prévalence en facteurs de pathogénicité est obtenue pour tous les échantillons. Les *Vibrios* confirmées par recherche sont « potentiellement pathogènes » tandis que celles confirmées par la présence de toxines sont « pathogènes ».

I.6. Mode de collecte, d'analyse et de traitements des données

I.6.1 Mode de collecte des données

Les échantillons sont achetés dans les points de vente correspondant aux critères d'inclusion en suivant les modes de conservations indiqués pour l'analyse microbiologique des aliments. En fixant que l'analyse proprement dite se fera pendant 3 mois (1 prélèvement par mois ou toutes les 3 semaines), 20 échantillons issus de 4 points de vente sont traités pour un prélèvement (10 de l'espèce tilapias et 10 des carpes ou autres) qui va se répéter mensuellement. Tous les échantillons prélevés adéquatement vont subir les analyses bactériologiques au Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement.

I.6.2 Mode d'analyse et de traitements des données

Les données sont saisies d'abord sur Microsoft Excel 2007 en suivant les conditions requises pour une base de données adéquate. Les données sont saisies pour chaque variable étudiée avec leur modalité et pouvant être codées (dictionnaire des variables). Des codes sont attribués pour les lieux de collecte afin de respecter l'anonymat des résultats :

- Catégorie I avec le lieu non précis de l'origine
- Catégorie II avec ses points de vente.
- Catégorie III avec ses points de vente

Chaque échantillon est numéroté suivant la numérotation du laboratoire (LHAE) par point de vente.

A partir de la base de données établie, trier à plat puis filtrer afin de vérifier et nettoyer les données manquantes (cases vides), les variables répétées (faute d'orthographe) ainsi que de faciliter l'analyse suivant les variables à considérer.

Une fois vérifiée, la base de données est enregistrée sous Microsoft Excel 2003, format auquel le logiciel statistique Epi info requiert.

En important la base sous Epi Info version 3.5.4, une vérification est établie (List) pour écarter toute erreur. Après, de nombreuses analyses sont à explorer suivant le résultat voulu.

- ✓ A partir de la fréquence (Frequencies), la prévalence de chaque germe est obtenue avec l'intervalle de confiance à 95% de significativité à accorder pour la population (IC 95).
- ✓ A partir du test chi-carré (Tables), des liaisons entre deux variables peuvent être testées notamment les facteurs qui peuvent être liés à la prévalence (ex : prévalence d'un germe par rapport aux espèces, catégorie, période de prélèvement, présentation à la vente,...: exploration du p-value significatif pour une valeur inférieure à 0,05)
- ✓ Pour les tailles d'échantillon faible (les variables qualitatives dont les effectifs théoriques d'une ou plusieurs cases du tableau de contingence sont inférieurs à 5), le Test chi-carré est remplacé par le Fisher Test qui est plus précis et n'induit pas d'erreur [43].

I.7 Matériels et Protocole analytique

La présente étude visant à caractériser des germes sur des poissons d'eaux douces, l'analyse est essentiellement basée sur une analyse microbiologique via une culture bactérienne avec une confirmation par MALDI-TOF et par PCR. Tous les modes opératoires concernant la microbiologie alimentaire sont régis par des normes lesquelles ont été suivies lors de la présente étude.

I.7.1 Conditions de prélèvement

Les modes de conservations indiqués pour l'analyse microbiologique des aliments selon le mode opératoire du LHAIE [44] sont suivis :

- Le prélèvement ne doit en aucun cas être touché par la main du manipulateur (ou celui qui prélève), par conséquent, les mains ainsi que les matériels de ce dernier doivent être désinfectés, notamment par de l'alcool (éthanol 70%).
- Le prélèvement doit tout de suite être mis dans un sachet stérile pour ne pas influencer sa qualité microbiologique (il s'agit d'un sachet atomisé empêchant l'entrée d'air)
- A ce stade, le prélèvement doit être bien identifié : date de prélèvement, point de prélèvement, heure du prélèvement, description de l'échantillon (entier ou morceau : muscles, chair, organes,...).
- Le prélèvement doit être mis sous froid juste après et jusqu'à la réception (dans une glacière ou sac isotherme).
- A la réception, la température doit être vérifiée, l'analyse commencera 24h après l'arrivée au plutard.

I.7.2 Protocole analytique pour l'obtention de la prévalence

En microbiologie alimentaire, tous les modes opératoires d'analyses sont régis par des normes [45], lesquels sont reconnus internationalement.

I.7.2.1. *Mode opératoire pour la recherche des Vibrios et Aeromonas : selon la norme ISO/TS 21872 relatif au Recherche de Vibrios potentiellement entéropathogènes*

Etant donné qu'il s'agit d'une recherche de *Vibrios* susceptibles d'induire une toxoinfection alimentaire, en basant sur la norme à satisfaire : « Absence dans 25g », les étapes de l'analyse se situent comme suit :

- Pré-enrichissement : Peser 25g de chair de poisson (prise d'essai) à diluer dans de l'Eau Peptonné Alcaline salée (EPAS) 225 ml. Après broyage, ce pré-enrichissement est incubé à 41,5° +/- 1°C pendant 18 h.

- A la sortie de l'étuve, un isolement du pré-enrichissement par épuisement sur 2 boîtes de gélose ChromAgar Vibrio et 2 boîtes de gélose Thiosulfate citrate bile saccharose (TCBS) est effectué par une oese. Les boîtes sont incubées à 37+- 1°C pendant 24+-3 h.
- Repiquer les colonies caractéristiques sur des boîtes de Gélose Nutritive Salée (GNS) : il s'agit de colonies mauves et colonies bleues sur ChromAgar Vibrio ; le cas échéant, repiquer les colonies jaunes et colonies vertes sur le milieu de culture Thiosulfate citrate bile saccharose(TCBS) à ré-isoler sur CHROMagar Vibrio puis obtention des colonies mauves et bleues caractéristiques. Pour les *Aeromonas*, les colonies caractéristiques ressemblent à celles des *Vibrios* à la différence que leur couleur sont moins prononcée (colonies mauves claires, bleu ciel, bleu blanchâtre). Sur GNS, une incubation à 37°C pendant 24+-3h sera effectuée.
- faire les Tests présomptifs : oxydase et coloration de gram (les *Vibrios et Aeromonas* sont des bactéries gram négatif et à oxydase positif)
- Identification sur galerie Api 20E ou Maldi-Tof: une première confirmation au Maldi-Tof pour les *Vibrios* et confirmation et identification d'espèces pour les *Aeromonas*.
- Pour la confirmation des *Vibrios*, des souches fraîches sur GNS subiront une extraction d'ADN et passeront à une analyse par PCR (ou Polymérase Chain Reaction): retenir comme positifs ceux qui le sont après PCR.

L'ADN est extrait soit par méthode Instagène soit par méthode Chelex. La base de l'extraction d'ADN consiste en une centrifugation et recueil du substrat :

- Sous hotte à flux laminaire, prendre 2 à 3 UFC de colonies à mélanger dans 200µg d'Instagène ou de Chelex
- Incuber 10mn à 56 °C puis porter à ébullition pendant 20mn pour la Méthode Instagène et seulement de l'ébullition pendant 8 à 10 mn pour Chelex
- Centrifuger à 3000g pendant 10mn à température ambiante pour Instagène et à 20000g pendant 10mn à 4°C (la centrifugeuse est réglée selon ces programmes)
- Récupérer dans un tube Eppendorf le substrat d'ADN surnageant

- Mesurer la densité optique puis conserver à -20°C

Suivant le protocole à suivre correspondant à chaque espèce de *Vibrios*, quelques µl de l'extrait d'ADN seront mélangés aux composants nécessaires pour la recherche de chaque espèce de *Vibrios* correspondante afin de réaliser le « Mix ». Le Tableau IV résume les composants nécessaires pour une réaction PCR à la recherche de *Vibrios*.

Tableau IV : Composants nécessaires pour une réaction PCR correspondant à chaque espèce de *Vibrios*

<i>Vibrio</i>	Enzyme	Primer	Tampon
<i>alginolyticus</i>	Firepol Polymerase	DNA Mix Valg-F1/R1	5µM
<i>Cholerae</i> vs <i>mimicus</i>	Firepol Polymerase	DNA VCF et VCMR	Tampon d'amplification
Parahaemo-lyticus	Firepol Polymerase	DNA Mix -Tox-R-4/7-5µM	10x sans MgCl2

Tableau IV: Composants nécessaires pour une réaction PCR correspondant à chaque espèce de *Vibrios* (suite)

<i>Vibrio</i>	Sel	Autres	Articles de référence
<i>alginolyticus</i>	MgCl2 50mM	Eau qualité dNTPs 2 mM,	PCR, Luo P. et Hu C. 2008-DAO 568pb
<i>Cholerae</i> vs <i>mimicus</i>	MgCl2 50mM	Eau qualité dNTPs 2 mM	PCR, Brauns et al, 1991-Appl-Env- Micr 388pb
Parahaemo-lyticus	MgCl2 50mM	Eau qualité dNTPs 2 mM	PCR, Kim et al., 1999 Yang et al.2008 ;Int J.Food Microb 368 pb

Le mix étant formé, l'amplification PCR proprement dit est effectuée.

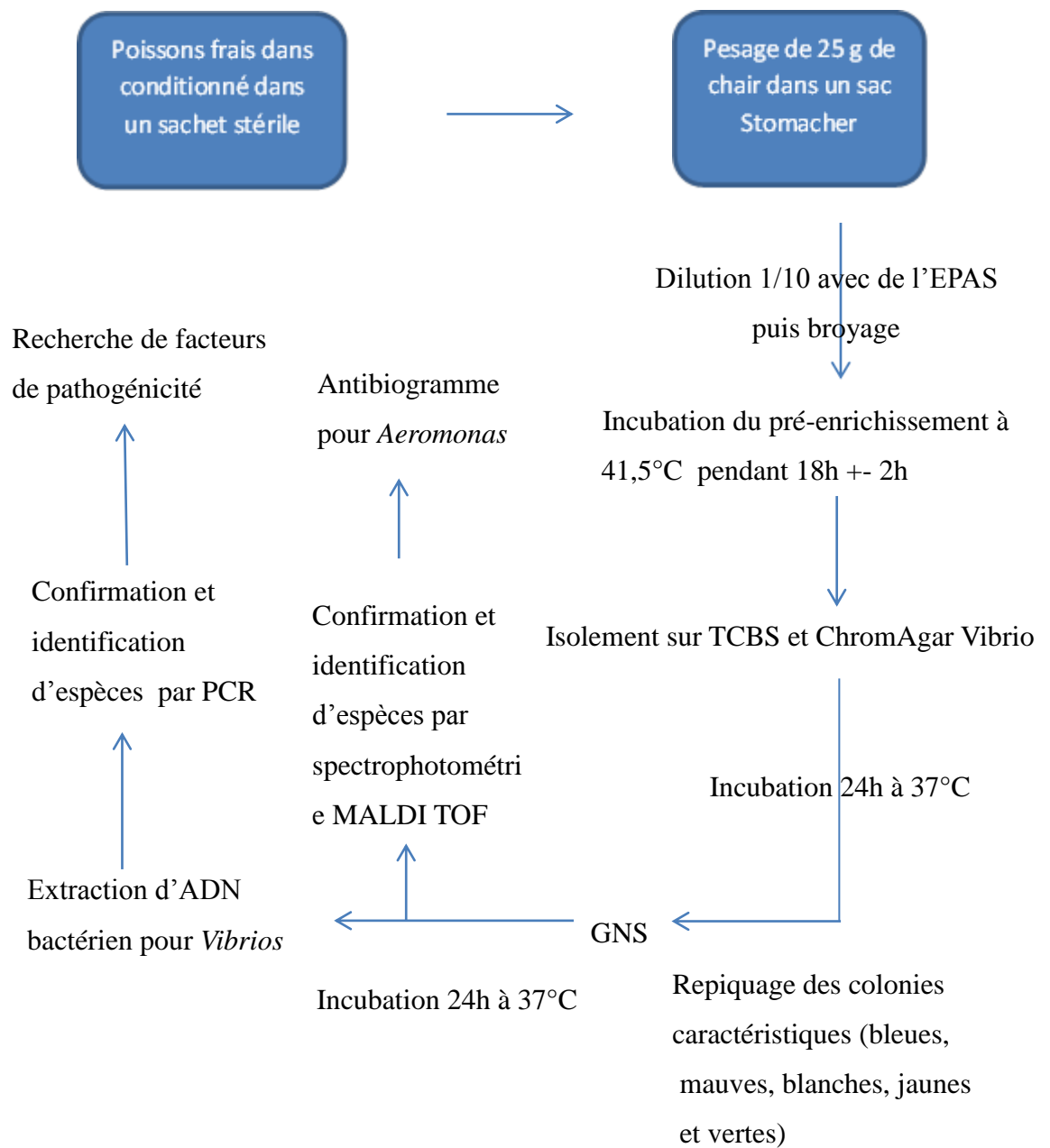
- les souches positives subiront après, un nouveau test PCR pour rechercher leurs facteurs de pathogénicité tandis que les souches d'*Aeromonas* subiront un antibiogramme.

- ✓ Pour les *Vibrio cholerae* : rechercher les facteurs de pathogénicité CtxA et CtxB, responsables des maladies cholériques dont les Primers sont respectivement Ctx2/Ctx3 et Ctx7/Ctx9B.
- ✓ Pour les *Vibrio parahaemolyticus* : recherche de la TDH /RH (l'hémolysine thermostable directe (TDH), l'hémolysine thermolabile (TLH) et l'hémolysine « *thermostablerelated hemolysin* » (TRH). dont les primers sont Primer-mix L-tdh / R-tdh – et Primer-mix L-trh/ R-trh

- La prévalence sera obtenue à partir des résultats obtenus : Présence ou Absence : après confirmation des espèces trouvées : noter « présence ou absence de *Vibrios* potentiellement entéropathogènes » et après recherche des facteurs de pathogénicité : indiquer la « présence ou absence de *Vibrio entéropathogène* ».

Les fiches paillasse des réactions PCR sont énoncées en Annexe 3.

En résumé, les étapes pour la recherche de *Vibrios* et *Aeromonas* se situent comme suit :



I.7.2.2. Mode opératoire pour la recherche de *Salmonella* spp (NF en ISO 6579): Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella* spp

Basé sur le critère « Absence dans 25g », les étapes pour la recherche de *Salmonella* spp sont :

- Pré-enrichissement: réaliser le pré-enrichissement à partir de 25g de chair de poisson à diluer dans de l'Eau Peptonnée (EPT) 225ml; après broyage, le pré-enrichissement sera incubé à 37°C pendant 20h.
- Enrichissement sélectif: Transfert de la culture du pré-enrichissement, respectivement :
 - ✓ 1 ml dans un tube de 10 ml de bouillon « Rappaport Vassiliadis » (RVS) que l'on incube à $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pendant $24 \pm 3\text{h}$.
 - ✓ 1 ml dans un tube de 10 ml de bouillon « Mueller Kauffman au tétrathionate-novobiocine » MKTTn que l'on incube à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 ± 3 .
- Isolement : A partir de chacun des bouillons, ensemercer avec une anse la surface de deux boîtes de gélose Xylose –Lysine – Désoxycholate (XLD) ou Hektoen et deux boîtes de ChromAgar Salmonella Plus (ensemencement par épuisement). Après avoir retourner les boites, les incuber dans une étuve à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24 \pm 3\text{h}$.
- Le lendemain, examiner les boites afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella* ainsi que les colonies atypiques susceptibles d'être des salmonelles :
 - ✓ Sur gélose XLD ou Hektoen, les colonies typiques de salmonelles sont à centre noir et sont entourés d'un halo clair transparent rouge dû à un changement de l'indicateur du milieu, les variantes Salmonella H₂S négatif (*S.paratyphi* A) sont roses à centre rose foncé. Les salmonelles lactose positif sont jaunes sans noircissement.
 - ✓ Sur gélose ChromAgar Salmonella+ qui est un milieu chromogène spécifique C8-estérase positif, les colonies typiques de salmonelles sont mauves telle qu'indique la Fig. 11.

- Identification biochimique : toute identification ou confirmation doit se faire à partir de colonies sur gélose nutritive; dans la présente étude, avant de faire une confirmation au Maldi-tof, repiquer à partir de chaque boîte (soit 4 boîtes au total) au moins 1 colonie caractéristique ou suspecte sur GN (gélose nutritive) puis 4 autres colonies si la première s'est révélée ne pas être une salmonelle (s'il se trouve une boîte avec moins de 5 colonies caractéristiques ou typiques, les retenir toutes), les boîtes sont ensuite incubées à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 24 ± 3 h.
 - Confirmation sur Maldi : étaler 2 à 3 colonies fraîches sur la cible Maldi laquelle sera guidée pour connaître le germe correspondant, retenir les résultats concrets fiables à bon degré de confiance.
 - Etablir la confirmation sérologique (Sérotypage) des souches isolées de Salmonelle avec au moins les sérums mélanges : cette étape requiert la connaissance pratique de l'immunologie, grâce à la remarquable fixation du complexe Ag/Ac (antigène/anticorps), on teste les souches avec les antisérums avec lesquelles elles forment une agglutination (signe de la fixation Ag/Ac) pour une réaction positive. Après avoir successivement testés certains sérums les plus essentiels, une formule (sérovar) est obtenue laquelle il faut voir la correspondance du sérotype dans le livre de Sérotypes des *Salmonella* selon Le Minor. Si la formule n'est pas obtenue du premier test sérologique, refaire une culture de la souche dans du milieu Sven Gard incubée à 37°C puis reprendre le Test le lendemain.
- Exemple : la formule 6,7 eh 1,2 (c'est-à-dire OMB6 HMB h etH1 2) correspond à S.larochelle.(la fiche paillasse pour les étapes d'un sérotypage est énoncée en annexe (Annexe 3.)*
- Indiquer la « présence ou l'absence de salmonelles dans **X g** d'échantillon sans précision du nom du sérotype ».

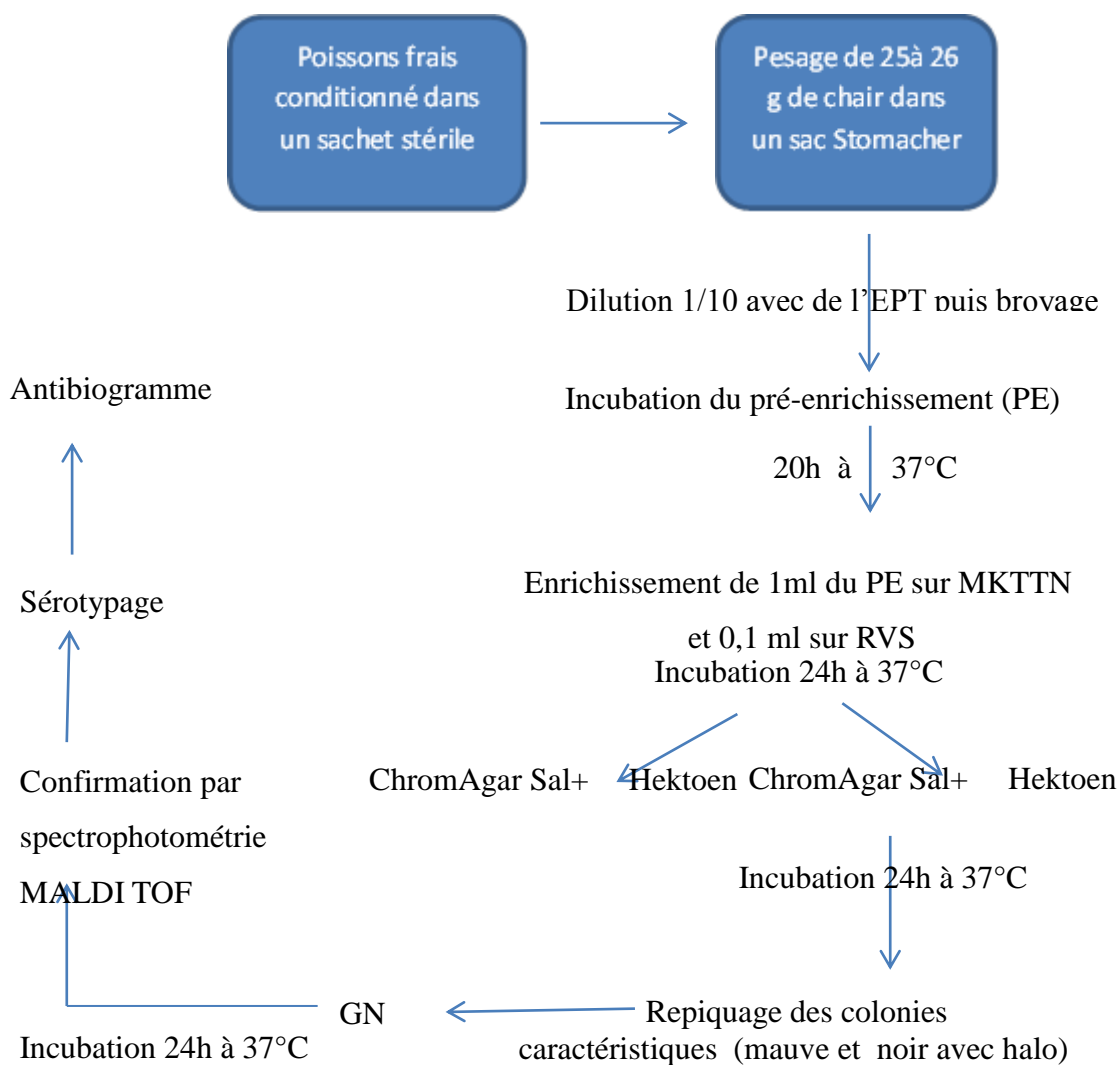


Figure 9 : Colonies caractéristiques de *Salmonella* sur ChromAgar

***Salmonella* +**

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 14 /12/16

En résumé, ci-après les étapes pour la recherche de *Salmonella* spp. :



**I.7.2.3 Mode opératoire pour le dénombrement des
Pseudomonas spp dans les viandes et produits carnés NF V 04-504**

Pour les *Pseudomonas*, l'analyse est quantitative c'est-à-dire une numération ou dénombrement, les étapes en sont :

- A partir de la prise d'essai de *Salmonella*, ensemencer 1ml de la prise d'essai sur une boîte de Pétri stérile pour la Suspension Mère ainsi que pour les dilutions décimales nécessaires; pour *Pseudomonas*, une dilution au 10^{ème} est effectuée (le diluant est le Tryptone sel)
- Coulage du milieu Cétrimide-Fucidine-Céphaloridine(CFC) qui, après homogénéisation est incubé à 25°C pendant 48h (on peut aussi faire tout de suite un ensemencement en surface sur milieu pré-coulé)
- Calcul du nombre de *Pseudomonas*/ml ou /g d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes choisies au niveau de deux dilutions donnant un résultat significatif et confirmé par la recherche d'oxydase (considérer comme *Pseudomonas* les colonies qui sont oxydase +).
- Pour apprécier de quelle espèce de *Pseudomonas* s'agit-il; repiquer les colonies sur Gélose nutritive (GN) et lire sur MALDI TOF.

**I.7.2.4. Mode opératoire pour le dénombrement d'*E.coli* β
glucuronidase+ (Méthode horizontale): NF ISO 16649-2 :**

- A partir de la prise d'essai pour la recherche de *Salmonella*, ensemencer 1 ml dans une boîte de Pétri pour la Solution mère et dans d'autres boîtes pour les dilutions respectives correspondantes.
- Couler le milieu Tryptone bile X-glucuronide(TBX), homogénéiser puis incubé à 44°C pendant 24h
- Lecture : Le milieu TBX est déjà sélectif pour *E.coli* bêta-glucuronidase + par conséquent il suffit de calculer le nombre d'*E.coli*/ml ou /g d'échantillon à partir du nombre de colonies « Bleues » (colonies caractéristiques : cf Fig.12) obtenues dans les boîtes choisies au niveau de deux dilutions dénombrables.

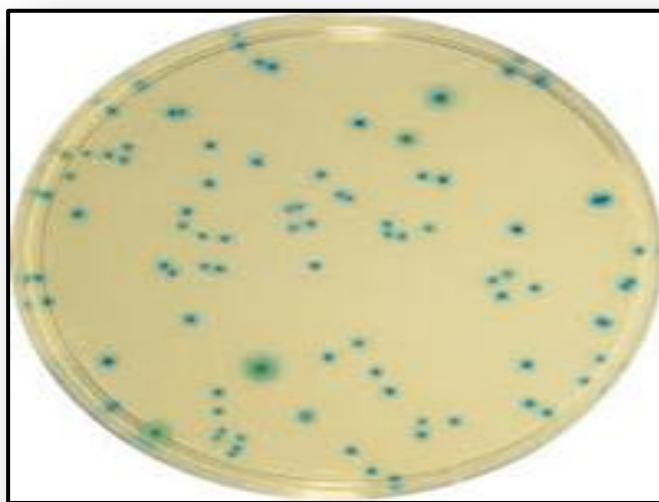


Figure 10 : Colonies caractéristiques d'*E.coli* béta-glucuronisidase positive sur TBX

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 13/12/16

I.7.2.5 Méthode horizontale pour dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfite –réductrices (BSR) se développant en conditions anaérobies : NF ISO 15213

On appelle Bactéries sulfite-réductrices les bactéries qui sont capables de précipiter en présence de sulfite en milieu anaérobiose. Les étapes du dénombrement restent toujours les mêmes pour les *E.coli* et les BSR à la seule différence que pour les BSR, l'ensemencement ne se fait pas sur boîtes mais en tubes de Tryptose au sulfite (TSC) lesquelles sont incubées à 37°C et que les colonies caractéristiques sont des colonies noires (voir Fig. 13). La lecture de ces colonies caractéristiques se fait en deux temps, d'abord après 24h d'incubation puis après 48h (le résultat après 24h est ré incubé); retenir le nombre de BSR compté et calculé après 48 h.

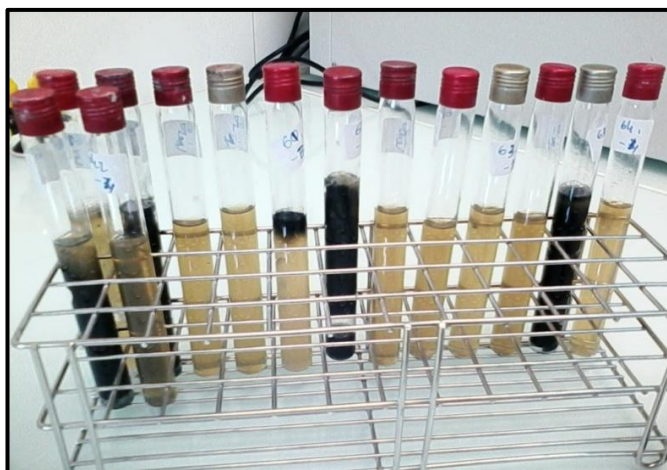


Figure 11 : Colonies caractéristiques de BSR sur TSC

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 15/12/16

**I.7.2.6. *Mode opératoire pour le dénombrement des
Entérocoques***

Les étapes et colonies caractéristiques sont les mêmes que pour les BSR excepté que l'ensemencement se fait dans des boîtes de pétri et le milieu de culture est le Bouillon à l'esculine d'Azote ou BEA, la lecture étant 24h après la culture.

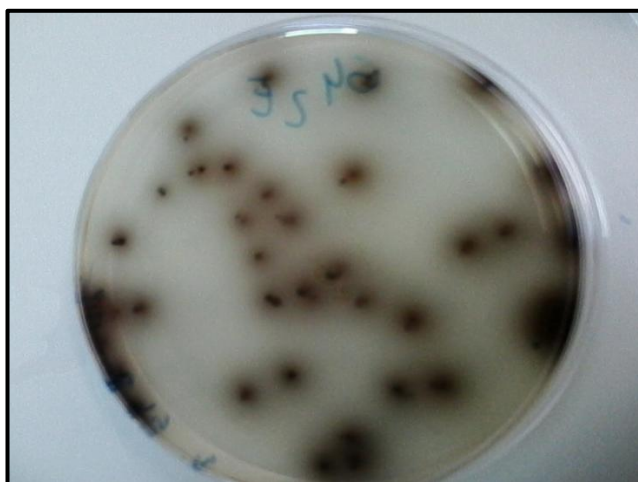
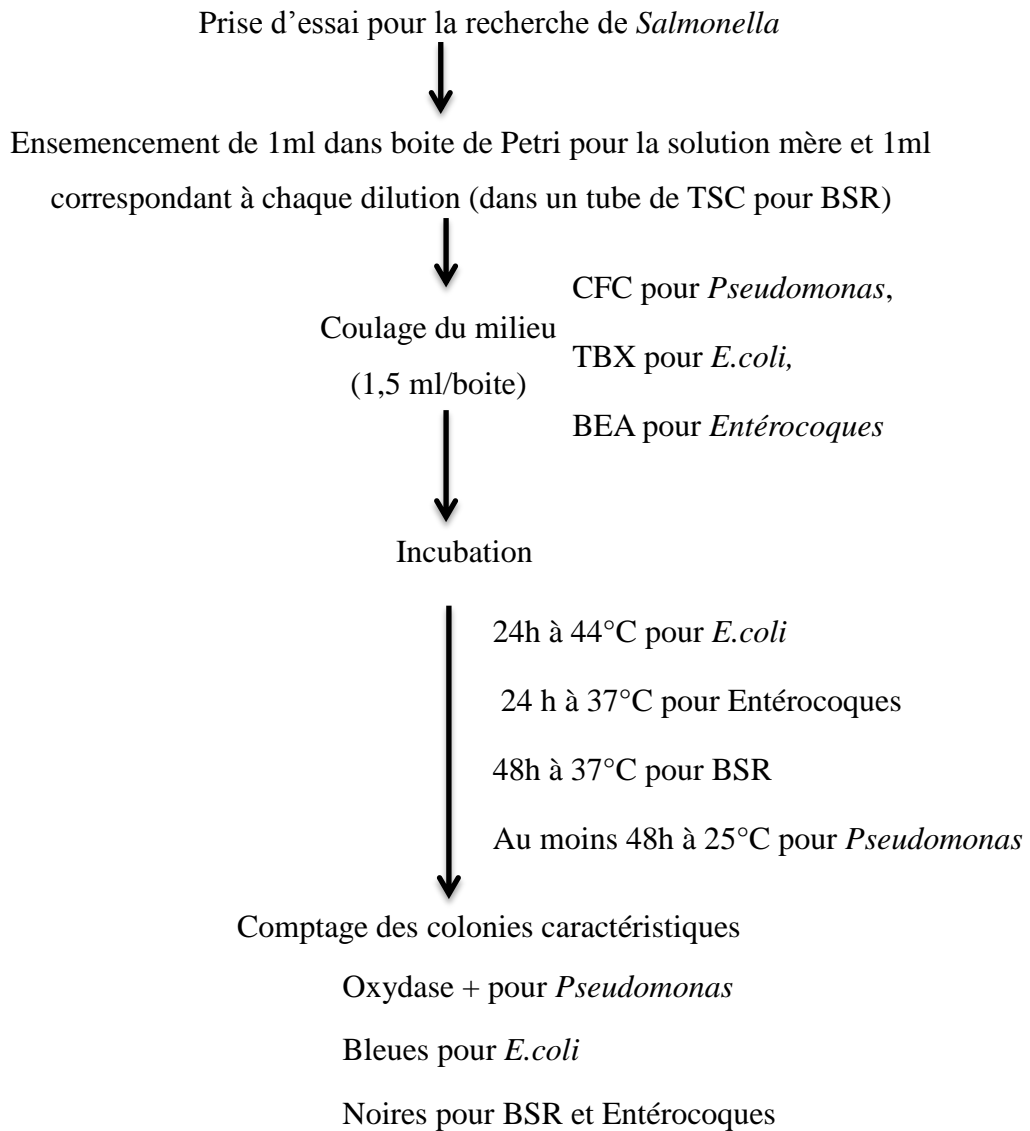


Figure 12 : Colonies caractéristiques des Entérocoques sur BEA

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 15/12/16

Les étapes pour le dénombrement peuvent se résumer comme suit :



I.7.3. Protocole analytique pour l'obtention des espèces et sérotypes bactériens

Les colonies caractéristiques après culture sont ré-isolées pour être confirmées et subir l'identification d'espèces soit au MALDI-TOF soit au PCR

I.7.4. Protocole analytique pour l'obtention de la pathogénicité

I.7.4.1 Antibiogramme

De façon simplifiée, les étapes d'un antibiogramme sont :

- A partir d'une colonie fraîche, repiquer une colonie à diluer dans de l'eau physiologique 9‰ jusqu'à avoir une turbidité équivalente à 0,5 de la gamme de McFarland ce qui correspond à une suspension bactérienne d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml.
- Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif.
- Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose (Mueller Hinton carré) dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.
- Déposer les disques en respectant la distance inter-discale adéquate. Si les boîtes sont abandonnées à la température du laboratoire trop longtemps avant le dépôt des disques, la bactérie peut commencer à croître conduisant à une fausse diminution de la taille des zones d'inhibition.
- Incuber les boîtes non renversées à 37°C pendant 24h puis mesurer les diamètres des zones d'inhibition.
- Interpréter selon les critères liés à chaque antibiotique[46].

I.7.4.2 Recherche de toxines

Les souches caractéristiques de *Vibrios* confirmées sont à nouveau analysées au PCR en vue de rechercher si elles possèdent les gènes de virulence lesquelles sont à l'origine de la forte pathogénicité de la souche.

- ✓ Pour les *Vibrio cholerae* : recherche les facteurs de pathogénicité CtxA et CtxB, responsables des maladies cholériques dont les Primers sont respectivement Ctx2/Ctx3 et Ctx7/Ctx9B.
- ✓ Pour les *Vibrio parahaemolyticus* : recherche de la TDH /RH (l'hémolysine thermostable directe (TDH), l'hémolysine thermolabile (TLH) et l'hémolysine « *thermostablerelated hemolysin* » (TRH) dont les primers sont Primer-mix L-tdh / R-tdh – et Primer-mix L-trh/ R-trh.

II.RESULTATS

II.1 Description de l'échantillon

Les 59 échantillons analysés sont décrits en fonction de l'origine du prélèvement, des espèces de poissons prélevés et leur description, de la présentation à la vente et du période de prélèvement qui sont respectivement présentés dans les Tableaux V à VIII.

Tableau V : Description des échantillons en fonction de l'origine du prélèvement et des espèces de poissons prélevés.

Espèce	*Cat.I(%) n=2 (3,39)	Cat.II(%) n=24(40,6)	Cat.III(%) n= 33(56)	Total n=59 (100)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	1	13	17	31(52,5)
Carpes (<i>Cyprinus carpio</i>)	1	8	11	20 (33,9)
Fibata(<i>Ophiocephalus striatus</i>)	0	2	4	6 (10,2)
Cyprin doré (<i>Carrassius auratus</i>)	0	1	1	2 (3,5)

*Catégorie d'origine des prélèvements : Cat.I, Cat.II, Cat.III

Tableau VI : descriptions des échantillons en fonction de l'espèce de poissons prélevés et leur description

Description échantillon	Tilapia (<i>O.niloticus</i>) n= 31	Carpe (C. <i>carpio</i>) n=20	Fibata (<i>O. striatus</i>) n =6	Cyprin doré n=2	Total (%) n=59 ¹ (100)
Entier	31	3	0	2	36 (61)
Morceau	0	17	6	0	23 (39)

¹: le nombre total d'échantillons est de 59 dont un échantillon contient en moyenne 1,58 (+/- 0,66) poissons (entier ou morceau).

Tableau VII : Description des échantillons en fonction de la présentation des prélèvements à la vente

Espèces	Table carrelée(%) n=18(30,5)	Température Ambiante¹(%) n= 37(62,7)	Sous-glace (%) n=2(3,4)	Elevage ² (%) n=2(3,4)	Total(%) n=50 (100)
Tilapia	9(29)	19(61,3)	2(6,5)	1(3,2)	31(52)
Carpes	7(35)	12(60)	0(0)	1(5)	20 (34)
Fibata	1(16,7)	5 (83,3)	0(0)	0(0)	0(10,2)
C. doré	1(50)	1 (50)	0(0)	0(0)	2 (3,8)

¹ : les échantillons présentés à température ambiante sont ceux qui se trouvent sur une table avec comme dessus des sachets réutilisables

² : les échantillons issus de l'élevage c'est-à-dire du bassin ou étang piscicole

Tableau VIII : Description des échantillons en fonction du période de prélèvement

Espèces	Ouverture pêche (%) n=45 (76, 3)	Clôture pêche (%) n=12(20,34)	Néant* (%) 2(3,39)	Total (%) n= 59 (100)
Tilapia	24	6	1	31(52,5)
Carpes	19	0	1	20 (33,9)
Fibata	0	6	0	6(10,2)
Cyprin doré	2	0	0	2(3,5)

*: produit sans contrainte de période de pêche, issu d'élevage

II.2 Résultats par rapport à la prévalence

II.2.1 Prévalence des bactéries recherchées

Pour les germes à rechercher dont *Vibrios*, *Aeromonas* et *Salmonella sp*, la prévalence des positifs pour les 59 échantillons analysés sont donnés dans le Tableau IX.

Tableau IX : Prévalence en *Vibrios*, *Aeromonas* et *Pseudomonas* des échantillons

Germes concernées	Fréquence	% (avec n=59)	Intervalle de confiance (95%)
<i>Vibrio</i> spp.	19	32,20	20,60-45,60
<i>Aeromonas</i> spp.	32	54,20	40,80-67,30
<i>Salmonella</i> spp.	25	42,4	29,60-55,90

Les échantillons analysés présentent une contamination de 32,2% en *Vibrio spp*, 54,2% en *Aeromonas spp* et 42,4 % en *Salmonella spp*. Ces prévalences obtenues semblent être indépendantes de la catégorie de prélèvement, de l'espèce des produits, du période de prélèvement et de la présentation à la vente : les tests statistiques ont donné des résultats non significatifs.

Tableau X : Prévalence en *Vibrios*, *Aeromonas* et *Salmonella sp* en fonction de l'espèce du produit

Espèces de poissons *	<i>Vibrios spp</i> (%) n= 19	<i>Aeromonas spp</i> (%) n=32	<i>Salmonella spp</i> (%) n=25
	p-value	p-value	p-value
Tilapia (n=31)	14 (45)	19 (61,3)	14(45,2)
Carpes (n=20)	3(15) 0,4	7 (35) 0,2	5 (25) 0,13
Autres (n=8)	2(25)	6 (75)	6 (75)

*seules les espèces de taille proche ont pu être analysés (tilapias et carpes)

Le Tableau X montre qu'il n'existe pas de liaison entre la prévalence en *Vibrios* /*Aeromonas*/ *Salmonella spp* et l'espèce de poissons : malgré que les prévalences observées montrent une différence pour les Tilapias comparées aux carpes, ces écarts observés ne sont pas statistiquement significatifs ($p > 0,05$) .

Tableau XI : Prévalence en *Vibrios*, *Aeromonas* et *Salmonella* en fonction du période de prélèvement

Période de prélèvement	<i>Vibrio spp.</i> (%) n= 19		<i>Aeromonas spp</i> (%) n=32		<i>Salmonella spp</i> (%) n=25	
	Effectif (%)	p-value	effectif (%)	p-value	effectif (%)	p-value
Clôture						
Pêche (n=12)	4(33,3)		10 (83,3)		9 (75)	
Ouverture		0,45		0,08		0,01
pêche (n=45)	15(33,3)		21(46,7)		16(35)	(RR=2,11)
Elevage (n=2)	0(0)		1 (50)		0 (0)	

D'après le tableau XI, que les échantillons soient prélevés en période de clôture ou d'ouverture de la pêche, la prévalence est statistiquement la même aussi bien pour les *Vibrios* que pour les *Aeromonas* ; par contre pour la *Salmonella spp.* , une différence significative liée à cette période de prélèvement est perçue: les échantillons prélevés en période de clôture de pêche présente 2,11 fois de risque d'être contaminés par du *Salmonella spp.* par rapport aux échantillons prélevés en période d'ouverture de la pêche.

Tableau XII : Prévalence en *Vibrios*, *Aeromonas* et *Pseudomonas* en fonction de la catégorie du prélèvement

Catégorie de prélèvement	<i>Vibrio</i> spp. (%) n= 19		<i>Aeromonas</i> spp. (%) n=32		<i>Salmonella</i> spp. (%) n=25	
	Effectif (%)	p-value	Effectif (%)	p-value	Effectif (%)	p-value
I (n=2)	0 (0)		1 (50)		0 (0)	
II (n=24)	9 (37,5)	0,52	13 (54,2)	1	13 (54,2)	0,2
III (n=33)	10 (30,3)		18 (54,5)		12 (36,4)	

Le Tableau XII montre que les poissons issus des marchés certifiés présentent les mêmes contaminations que ceux issus des marchés populaires de point de vue statistique; probablement, ces deux catégories auraient une même source de produits.

Tableau XIII : Prévalence en *Salmonella* spp. en fonction de la présentation des échantillons à la vente

Présentation à la vente	N échantillons n=59	Fréquence.	%	p-value
Température ambiante	37	14	37,83	
Table carrelée	18	11	61,1	0,09
Sous glace	2*	0	0	
Elevage	2*	0	0	

*analyse effectuée sur les valeurs comparables (température ambiante et table carrelée)

Basé sur la contamination probable liée à la condition hygiénique, la prévalence en *Salmonella* spp. est testée par rapport à la présentation à la vente. D'après les résultats énoncés dans le Tableau XIII, les échantillons présentés sous glace et prélevés dans les bassins piscicoles (conditionnées sous glace durant l'acheminement) n'ont pas montré de contamination en *Salmonella* spp.; toutefois on ne peut se prononcer que ce paramètre soit un facteur de risque étant donné que les échantillons ne sont pas représentatifs cependant les échantillons issus 'une table carrelée ou présentés à température ambiante présentent les mêmes prévalences statistiquement.

Tableau XIV : Prévalence en *Salmonella* selon la description des échantillons

Description échantillon	N échantillons n=59	Total <i>Salmonella</i> spp. (%) n=25 (100)	p-value
Entier	36	15 (41,7)	0,55
morceau	23	10 (43,5)	

Le Tableau XIV montre que la contamination en *Salmonella* spp. est statistiquement la même que le poisson soit présenté en entier ou en morceau (c'est-à-dire une préparation pouvant entraîner une contamination manipulative probable).

II.2.2. Prévalence des bactéries dénombrées

Au total quatre bactéries ont été dénombrées, le Tableau XV montre la prévalence (présence) de chacune des bactéries dans les échantillons analysés tandis que le Tableau XVI énonce les nombres de chaque bactérie rencontrée et comparés aux normes.

Tableau XV : Prévalence des germes de dénombrement

Bactéries dénombrement	pour	N	nombre positifs	%	IC 95%
		échantillons			
<i>Pseudomonas spp.</i>					
		59	55	93,2	84-98,1
<i>E.coli</i>					
		59	52	88,1	77,1-95,1
BSR					
		44	33	75	60-87
Entérocoques					
		44	44	100	100-100

D'après le Tableau XV, il est constaté que plus que la moitié de tous les échantillons sont contaminés en *Pseudomonas*, *E.coli*, *BSR*, *Entérocoques*.

Or, en termes de dénombrement, la prévalence en se basant sur la présence n'est pas concluante mais il faut comparer les nombres de bactéries comptés par rapport à la norme exigée dans les critères.

En notant que les normes exigent un nombre égal à :

- 10 ufc/g pour l'*E .coli*
- 2 ufc/ ml pour les BSR
- 0 ufc/ ml pour l'entérocoque (pour de l'eau de consommation mais non spécifié pour les poissons et inférieure à $2,5.10^3$ pour céphalopodes)
- non spécifié pour *Pseudomonas*,

La Prévalence des échantillons présentant un nombre supérieur et inférieur à ces normes est énoncée dans le Tableau. XVI.

Tableau XVI : Prévalence des échantillons présentant un nombre inférieur ou supérieur à la norme pour chaque germe dénombré

Germes dénombrés	Normes (UFC/ml)	Prévalence des échantillons présentant un nombre < norme (%)	Prévalence des échantillons présentant un nombre > norme (%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	-
<i>E .coli</i> (n= 59)	10	12	48
<i>BSR</i> (n=45)	2	24	76
<i>Entérocoques</i> (n=45)	0 (pour eau potable) < 2,5.10 ³ pour céphalopodes (streptocoques fécaux)	18	82

Ce tableau montre que non seulement la prévalence est très forte mais le nombre de bactéries présentes dans les échantillons dépassent largement les normes.

II.3. Résultats par rapport à la variété d'espèces

II.3.1 Les variétés d'espèces de *Vibrios*

Trois types de PCR ont été lancés pour confirmer 3 espèces de *Vibrio* évoquant des colonies caractéristiques après culture à savoir le *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, Particulièrement, les colonies qui ont donné un résultat « *V.albensis* » au Maldi Tof ont été lancées en PCR *V.cholerae* étant donné les commentaires du résultat Maldi et que *Vibrio cholerae* n'est pas incluse dans la base des données. Ainsi, les espèces confirmées avec leur prévalence respective sont résumées dans la figure 15.

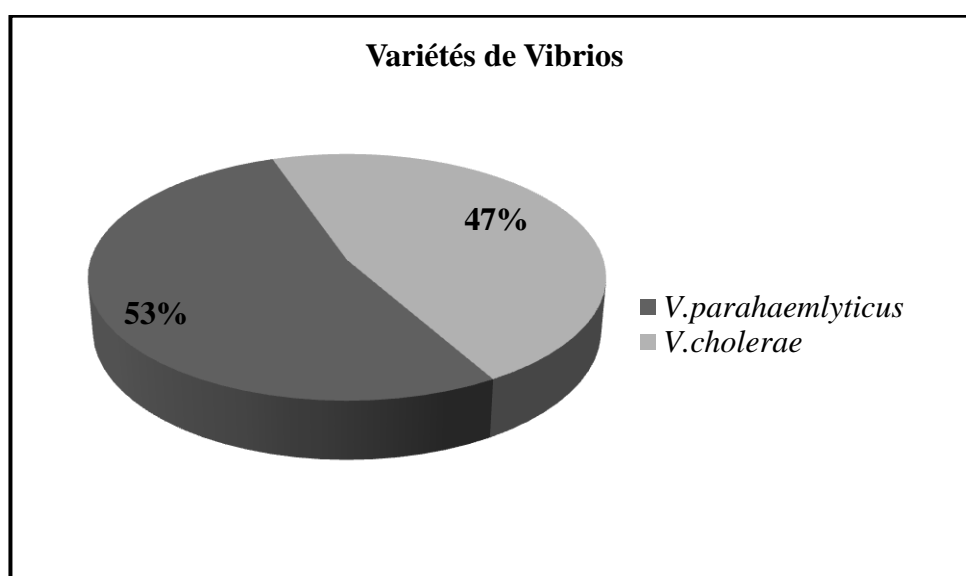


Figure 13 : Espèces de *Vibrios* rencontrées avec leur prévalence

Parmi les 32,2% de *Vibrios* rencontrées, 53% (29-76%) sont constitués de *V.parahaemolyticus* et 47% (24,4-71,1%) de *V.cholerae* ; par contre aucun *V.alginolyticus* n'a été noté.

Les figures capturées montrant la positivité des résultats PCR des *Vibrios* sont présentées dans les figures 16 et 17.

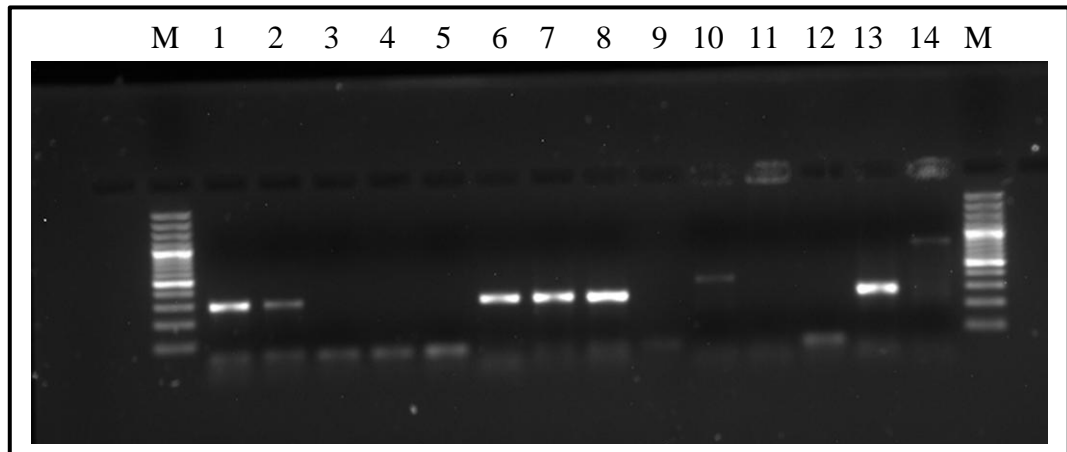


Figure 14 : Extrait d'une image PCR illustrant les bandes positives au *V.cholerae* (300pb)

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 16/12/16

Commentaires :

M : Marqueur de poids moléculaire (la 3^{ème} bande équivaut à 300 paires de base (pb))

1 : Témoin positif au *Vibrio cholerae* diluée au 4,8 E1 (E1 étant une dilution au 10^{ème} de l'échantillon de départ.

2 : Témoin positif diluée au *Vibrio cholerae* 4,8 E2

3 : Témoin négatif (eau distillée)

4 à 14 : extraits d'ADN des colonies caractéristiques de *Vibrio albensis*(après *Maldi Tof*) isolées sur les poissons analysés

Les échantillons 6,7, 8 et 13 montrent des bandes à 300pb sur la même lignée des témoins positifs ce qui annonce que ces extraits d'ADN sont bien des *Vibrio cholerae*.

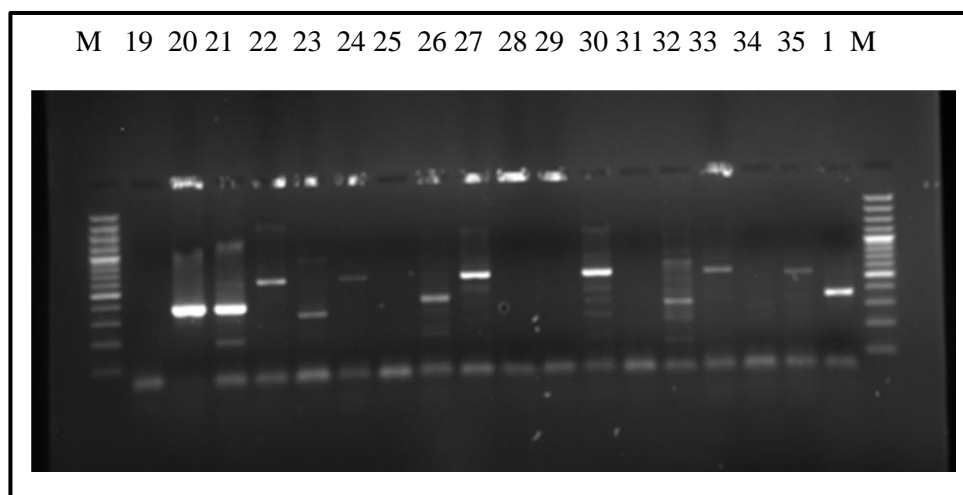


Figure 15 : Extrait d'une image illustrant les bandes positives au

***V. parahaemolyticus* (368pb)**

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 16/12/16

Commentaires :

M : marqueur de poids moléculaire

19, 25, 31 : Eau distillée pour contrôle de contamination

20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 : extraits d'ADN des colonies caractéristiques de *Vibrio parahaemolyticus* après Maldi tof isolées sur les poissons analysés

1 : Témoin positif au *Vibrio parahaemolyticus* à 368pb

Les échantillons 20, 21, 23 sont positifs au *Vibrio parahaemolyticus*.

Afin de déterminer si les espèces de *Vibrios* rencontrées sont liées aux espèces de poissons ou période de prélèvement, une analyse statistique a été effectuée et résumée respectivement dans les Tableau XVII et XVIII.

Tableau XVII : Espèces de *Vibrios* trouvées en fonction de l'espèce du produit à analyser

Espèce échantillons	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>p-value</i>
	n=9	n=10	
	<i>Frequence (%)</i>	<i>Freq (%)</i>	
Tilapia (n=31)	7 (22,6)	7(22,6)	0,23
Carpes (n=20)	2 (10)	1(5)	
Fibata (n= 6)	0 (0)	1 (16,7)	
Cyprin doré (n=2)	0 (0)	1(50)	

Tableau XVIII : Espèces de *Vibrios* trouvées en fonction de la période de prélèvement

Période de prélèvement	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>p-value</i>
	n=9	n=10	
	<i>Frequence (%)</i>	<i>Frequence (%)</i>	
Ouverture pêche (n=12)	8(18)	7(15,6)	0,53
Clôture pêche (n=45)	1(8,3)	3 (66)	

Le Tableau XVII et XVIII montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre la variété de *Vibrios* observée et les espèces des échantillons ainsi que la période de prélèvement.

II.3.2. Les variétés d'*Aeromonas*

Plusieurs espèces d'*Aeromonas* à bon degré au résultat Maldi sont résumées dans le tableau ci-après, à noter qu'un échantillon peut posséder plusieurs espèces à la fois.

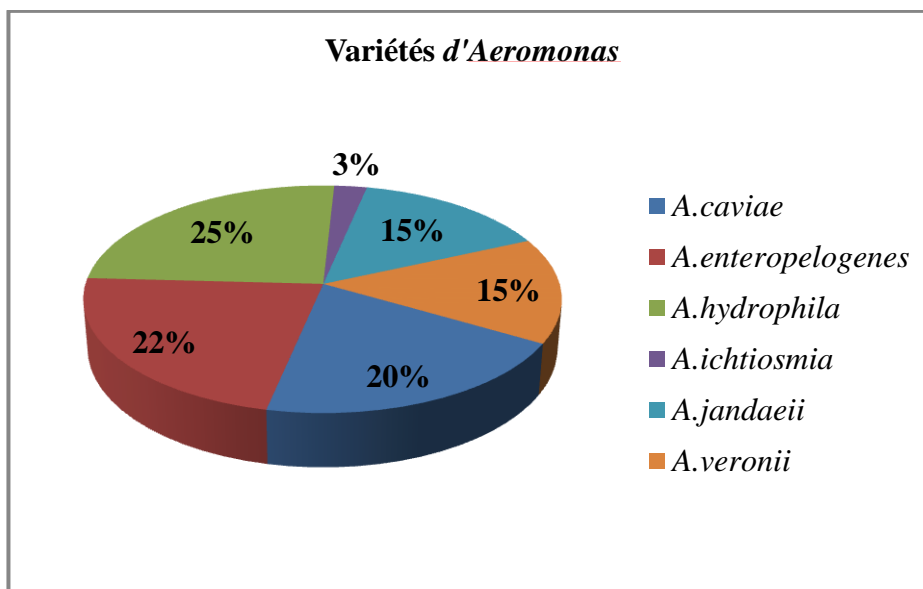


Figure 16 : Variétés d'*Aeromonas* rencontrées dans les poissons d'eaux douces

La figure 16 montre qu'avec six variétés d'*Aeromonas* rencontrés, la variété la plus pathogène à savoir *A. hydrophila* reste la plus fréquente avec 25% (13-41,2) de tous les *Aeromonas*.

Afin de déterminer s'il y a une corrélation entre la variété d'*Aeromonas* rencontrée et l'espèce de poissons, un Test a été effectué et dont le résultat figure dans le Tab.XIX.

Tableau XIX : Variétés d'*Aeromonas* prédominant dans chaque espèce de poissons

Espèces d' <i>Aeromonas</i>	Tilapia n=31	Carpes n=20	p-value
	Fréquence (%)	Fréquence (%)	
<i>A.hydrophila</i> n=10 (25)	7 (22,6)	3 (15)	
<i>A.ichthiosmia</i> n=1 (2,5)	1 (3,2)	0 (0)	
<i>A.jandaeii</i> n=6 (15)	2 (6,5)	1 (5)	0,12
<i>A.veronii</i> n=6 (15)	3 (9,7)	1 (5)	
<i>A.caviae</i> n=8 (20)	2 (6,5)	4 (20)	
<i>A.enteropelogenes</i> n=9 (22,5)	4 (12,9)	4(20)	

Le Tableau XIX montre que il n'existe pas de relation entre la variété d'*Aeromonas* et les espèces de poissons à valeur comparables, les écarts observés dans le tableau n'est pas significatif.

II.3.3 Les variétés de *Pseudomonas*

Pour le dénombrement des *Pseudomonas*, les types de colonies ont été repiqués puis identifiés au Maldi Tof afin de connaître l'espèce correspondant à chaque type de colonie, le résultat est donné dans la Figure 19.

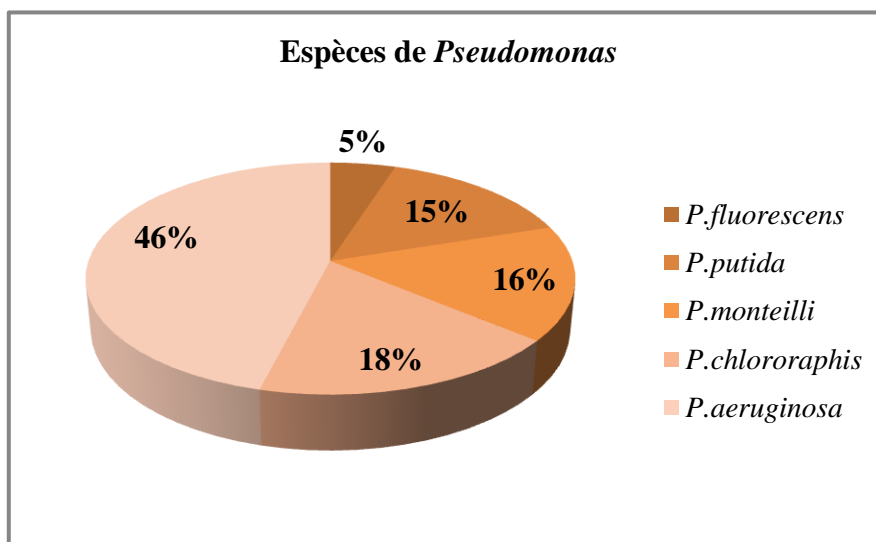


Figure 17 : Variétés de *Pseudomonas* rencontrés lors du dénombrement

Pour *Pseudomonas*, l'espèce la plus pathogène (*P.aeruginosa*) est présentée à une prévalence assez forte : 46 (20,5-55).

II.3.4 Les sérotypes des Salmonelles

Le sérotypage des *Salmonelles* est effectué par une méthode immunologique en explorant la fixation Ag/Ac aboutissant à une formule sérotypique correspondant à chaque germe analysé. Les détails sur le protocole de sérotypage est énoncé en Annexe 4. On a constaté 13 sérotypes identifiables tandis que certaines souches manquaient de sérum, d'autres étaient totalement non identifiables à cause de leur auto-agglutination.

Le résultat résumant les sérotypes des *Salmonella* rencontrés sont résumés dans le Tableau XX.

Tableau XX : Les sérotypes des souches de *Salmonella* dans les poissons analysés

Sérotype	Nombre	%	IC 95 (%)
autoagglutinable*	7	30,40	13,20 -52,90
<i>S.Thompson</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Valdosta</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.OMC *</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.ParatyphiB</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Norwich</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Nitra</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Neumuenster</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Montevideo</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Midway</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Larochelle</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Kiel</i>	3	13,00	2,80-33,60
<i>S.Kallo</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.Haardt</i>	1	4,30	0,10-21,90
<i>S.chingola</i>	1	4,30	0,10-21,90
Total	23	100	-

Le sérotype à risque dans la liste est le *S.paratyphi B* mais reste toutefois à faible prévalence soit 4,30 (0,10-21,90).

II.3.5 Les variétés d'entérocoques

A chaque prélèvement, quelques colonies d'entérocoques sont repiqués sur gélose nutritive (GN) puis analysés au Maldi Tof afin d'apercevoir les variétés existantes. Le résultat est résumé dans le Tableau XXIV.

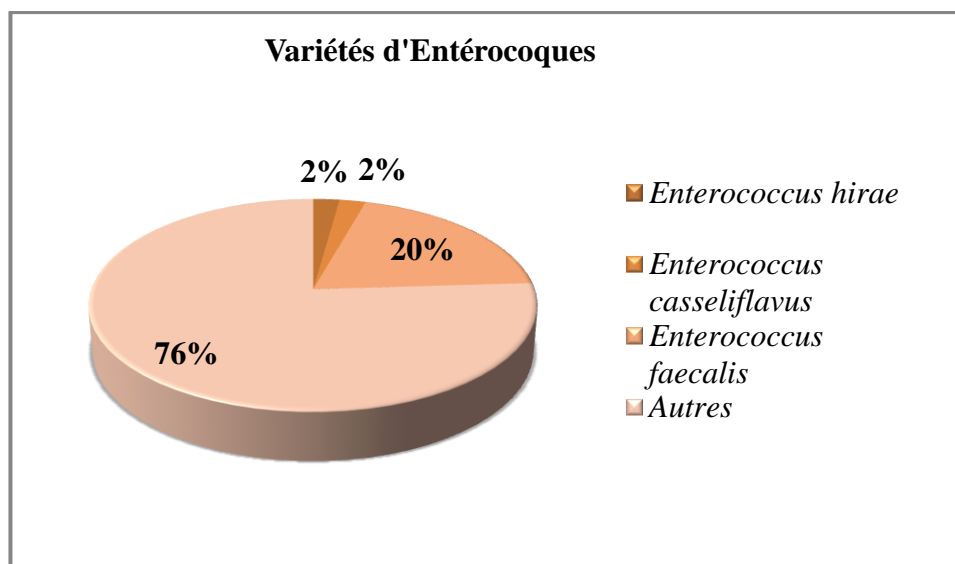


Figure 18 : Variétés d'entérocoques rencontrées dans les poissons d'eaux douces analysés

Seules trois variétés d'Entérocoques ont pu être identifiées par MALDI TOF, les autres nécessitent une autre méthode de confirmation qui n'a pas été utilisée dans la présente étude ; même cas pour les BSR.

L'*Enterococcus faecalis*, l'espèce à fort potentiel de pathogénicité prédomine avec 18,2% (8,2-33) de tous les entérocoques observés.

II.4. Résultat par rapport à la pathogénicité

II.4.1 Résultat par rapport à l'antibiorésistance

- ✓ 11 souches de *Pseudomonas* ont été testées à plusieurs listes d'antibiotiques à savoir, qui son assez fréquents et visés spécifiquement pour tester les *Pseudomonas aeruginosa* : le Tableau XXI montre le résultat obtenu.

Tableau XXI: Résultat de l'antibiogramme sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques	S (IC 95%)	I (IC 95%)	R (IC 95%)
Amikacine	11(100-100)	0	0
Céfépime	11(100-100)	0	0
Ciprofloxacine	11(100-100)	0	0
Tobramycine	11(42,3-79,30)	0	0
Aztréonam	0	11(100-100)	0
Gentamicine	11(100-100)	0	0
Pipéracilline+Tazobactam	11(100-100)	0	0
Imipénème	11(100-100)		
Ceftazidime	11(100-100)	0	0
Pipéracilline	11(100-100)	0	0
Ticarcilline+Ac. clavulanique	11(100-100)	0	0
Ticarcilline	11(100-100)	0	0

Avec S : sensible, I : Intermédiaire, R : Résistant

Aucune antibiorésistance n'a été noté pour les souches de *Pseudomonas*, toutes les souches sont sauvages.

- ✓ Pour les souches de *Salmonella* : les antibiotiques utilisés ainsi que les réactions obtenues sont énoncés dans le Tableau XXII.

Tableau XXII: Résultat de l'antibiogramme sur les souches de *Salmonella sp*

Antibiotiques	N souches testées	S (IC 95%)	I (IC 95%)	R (IC 95%)
Amikacine	1	1(100-100)	0	0
Cefoxitine	1	1(100-100)	0	0
Ciprofloxacine	3	3(100-100)	0	0
Fosfomycine	2	1(1,30-98,7)	2	1(1,30-98,7)
Pip+Tazobactam	1	1(100-100)	0	0
Norfloxacin	10	10(100-100)	0	0
Gentamicine	10	10(100-100)	0	0
Ceftazidime	9	4(12,3-74)	4(12,374)	1(0,3-44,5)
Ertapénème	10	10(100-100)	0	0
Mecilliname Acide clavulanique	5	0	0	5 (100-100)
	8	8(100-100)	0	0

Le Tableau XXII montre que les *Salmonella spp* isolés des poissons d'eaux douces analysés présentent une résistance accrue aux Mécilliname, Ceftazidime (0,3-44,5) et Fosfomycine (1,30-98,7).

✓ Pour les souches d'*Aeromonas* :

On a noté résistance aux Colistine, Fosfomycine et Ceftazidime, le résultat de l'antibiogramme se situe comme suit :

Tableau XXIII : Résultat de l'antibiogramme pour les souches d'*Aeromonas*

Antibiotiques	S (IC 95%)	I (IC 95%)	R (IC 95%)
Amikacine	29(100)	0	0
Ceftazidime	27(77,20-99,20)	0	2(0,8-2,80)
Ciprofloxacine	29(100-100)	0	0
Colistine	18(42,30-79,30)	0	11(20,70-55,70)
Fosfomycine	25(68,3-96,1)	0	4(3,9-31,7)
Gentamicine	29(100-100)	0	0
Pipéracilline+ Tazobactam	29(100-100)	0	0

D'autres antibiogrammes ont été réalisés notamment sur les souches d'*Enterococcus* (*casseliflavus*, *faecalis* et *hirae*), les Tableaux XXIV, XXV et XXVI représentent respectivement les résultats obtenus.

✓ Les autres antibiogrammes réalisés :

➤ *Enterococcus casseliflavus*

Tableau XXIV: Résultat d'antibiogramme pour une souche d'*Enterococcus casseliflavus*

Antibiotiques	S (IC 95%)	I(IC 95%)	R (IC 95%)
Amikacine	1(100)	0	0
SXT	1(100-100)	0	0
Ampicilline	1(100-100)	0	0
Norfloxacin	1(100-100)	0	0
Ertapénème	1(100-100)	0	0
Gentamicine	1(100-100)	0	0
Chloramphénicol	0	1(100-100)	0

➤ *Enterococcus faecalis*

Tableau XXV: Résultat d'antibiogramme pour une souche d'*Enterococcus faecalis*

Antibiotiques	S (IC 95%)	I (IC 95%)	R (IC 95%)
Amikacine	1(100)	0	0
SXT	1(100-100)	0	0
Ampicilline	1(100-100)	0	0
Norfloxacin	1(100-100)	0	0
Ertapénème	1(100-100)	0	0
Gentamicine	0	1(100-100)	0
Chloramphénicol	0	1(100-100)	0

L'*Enterococcus casseliflavus* et l'*Enterococcus faecalis* n'ont montré aucune résistance par rapport aux antibiotiques testés.

➤ *Enterococcus hirae*

Tableau XXVI : Résultat d'antibiogramme pour une souche d'*Enterococcus hirae*

Antibiotiques	S (IC 95%)	I(IC 95%)	R (IC 95%)
Amikacine	1(100-100)	0	0
Cefoxitine	1(100-100)	0	1(100-100)
Ciprofloxacine	100(100-100)	0	0
Céfépime	1(100-100)	0	0
Fosfomycine	0	0	1(100-100)
Gentamicine	1(100-100)	0	0
Norfloxacine	1(100-100)	0	0
Ceftazidime	1(100-100)	0	0
Ertapénème	1(100-100)	0	0
Mecilliname	0	0	1(100-100)
chloramhénicol	1(100-100)	0	0
Ampicilline	0	0	1(100-100)

Pour l'*Enterococcus .hirae*, quelques résistantes par rapport à Cefoxitine, Fosfomycine, Mécilliname et Ampicilline sont notées.

Conclusion partielle :

Concernant l'antibiogramme, seules *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus casseliflavus* n'ont pas montré de résistance ce qui signifie que ces germes sont d'origine sauvage.

II.4.2. Résultat par rapport à la production de toxines

Les *Vibrio parahaemolyticus* confirmés après PCR ont subi une nouvelle réaction PCR afin de détecter leur appartenance par rapport à deux facteurs de pathogénicité, le résultat obtenu est résumé dans le Tableau XXVII.

Tableau XXVII : Résultat des facteurs de pathogénicité des *V. parahaemolyticus*

Facteurs de pathogénicité	de nombre négatifs (N=10)	%	IC 95%
Tdh	10	100	100-100
Trh	10	100	100-100

Les facteurs de pathogénicité des *Vibrio parahaemolyticus* Tdh/rh sont négatifs à 100%

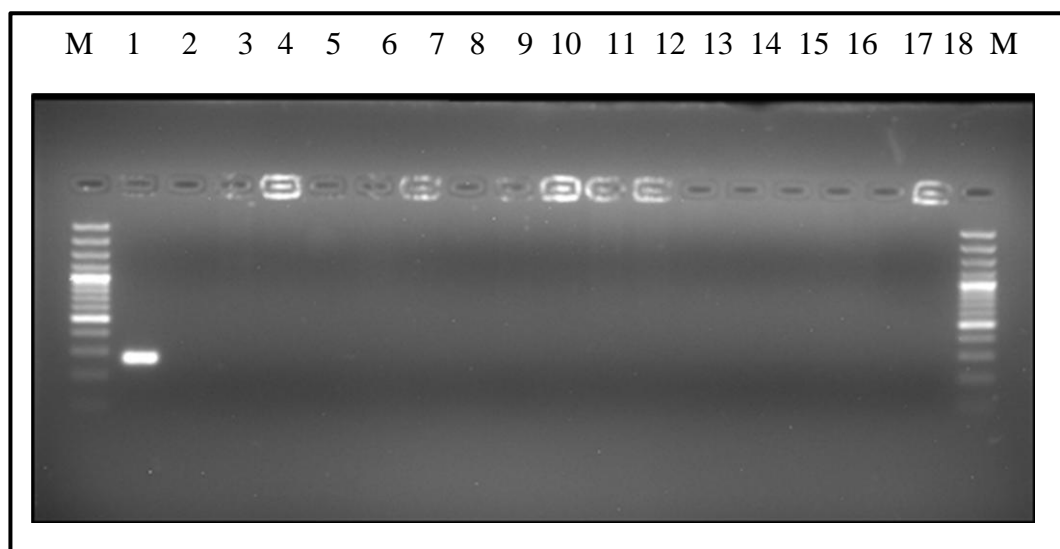


Figure 19 : Image du résultat négatif après PCR Tdh/rh (la bande visible étant le témoin)

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 16 /12/16

Commentaires :

M : marqueur de poids moléculaire

1 : Témoin positif Tdh

2 à 18 : échantillons positifs au *Vibrio parahaemolyticus* isolés des poissons analysés

Tous les échantillons sont négatifs à la présence de la Tdh/rh, ce sont des *Vibrio parahaemolyticus* non entéropathogènes.

Pareillement, les *V.cholerae* confirmés après PCR ont subi une nouvelle réaction PCR, le Tableau XXVIII montre si les *V.cholerae* possèdent les facteurs de pathogénicité CTxA/CTxB ou non.

Tableau XXVIII : Résultat des facteurs de pathogénicité des *Vibrio cholerae*

Facteurs de pathogénicité	nombre négatifs (N=10)	%	IC 95%
CTxA	10	100	100-100
CTxB	10	100	100-100

Les facteurs de pathogénicité des *Vibrio cholerae* CTxA et CTxB sont négatifs à 100%

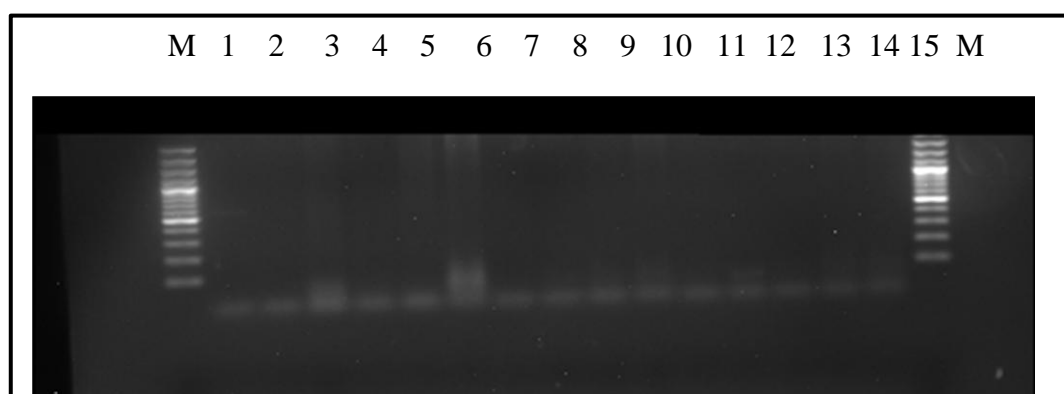


Figure 20 : Image du résultat négatif après PCR CTxA/CTxB

Source : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena © 16/12/16

Commentaires :

M : marqueur de taille moléculaire

1 : Témoin positif

2, 6, 10, 15 : Témoin négatif (eau distillée°)

3à 5, 7à 9, 11 à 14 : les échantillons positifs au *Vibrio cholerae* isolés des poissons

Tous les échantillons sont négatifs à la présence CtxA/CtxB, ce sont des *Vibrio cholerae* non entéro-pathogènes.

Les deux derniers tableaux permettent d'énoncer que malgré une prévalence assez élevée en *Vibrio* potentiellement entéro-pathogènes, on peut affirmer que parmi les lots de poissons analysés, il y a « absence de *Vibrio entéro-pathogènes* ».

II.5 Résultat par rapport à la caractérisation d'autres germes

A part les germes visées recherchées au départ, toutes les colonies non caractéristiques dans chaque boîte ont été repiquées afin d'identifier toutes les autres microbiologies des poissons. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXIX.

Tableau XXIX: Liste des germes rencontrés lors de l'étude par ordre d'importance en effectif avec leur prévalence et Intervalle de confiance

Germes concernées	Effectif	% (N=59)	Intervalle de confiance (95%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	30,50	19,20-43,90
<i>Enterobacter cloacae</i>	18	30,50	19,20-43,90
<i>Shewanella putrefaciens</i>	16	27 ,10	16,40-40,30
<i>Proteus vulgaris</i>	16	27,10	16,40-40,30
<i>Shewanella algae</i>	16	27,10	16,40-40,30
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	10	16,90	8,40-29,00
<i>E .coli</i>	10	16,90	8,40-29,00
<i>Klebsiella variicola</i>	7	11,9	4,90-22,90
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7	11,90	4,90-22,90
<i>Providencia alcalifaciens</i>	6	10,20	3,80-20,80
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	6	10,20	3,80-20,80
<i>Morganella morganii</i>	5	8,50	2,80-18,70
<i>Cronobacter sakazakii</i>	4	6,80	1,90 16,50
<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	4	6,80	1,90-16,50
<i>Escherichia hermanii</i>	3	5,10	1,10-14,10
<i>Edwardsiella tarda</i>	3	5,10	1,10-14,10
<i>Proteus rettgeri</i>	3	5,10	1,10-14,10
<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	3	5,10	1,10-14,10

Tableau XXIX : Liste des germes rencontrés lors de l'étude par ordre d'importance en effectif avec leur prévalence et Intervalle de confiance (suite)

Germes concernées	Effectif	% (N=59)	Intervalle de confiance (95%)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	3,40	0,40-11,70
<i>Enterobacter kobei</i>	2	3,40	0,40-11,70
<i>Providencia rettgeri</i>	2	3,40	0,40-11,70
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1	1,70	0,00-9,10
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	1,70	0,00-9,10
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1,70	0,00-9,10
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1,70	0,00-9,10
<i>Citrobacter youngae</i>	1	1,70	0,00-9,10
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	1,70	0,00-9,10
<i>Comamonas kerstersii</i>	1	1,70	0,00-9,10

II.6 Récapitulation des résultats par rapport à l'Objectif principal

En résumé les poissons d'eaux douces analysés ont une prévalence de :

- 32,2% en *Vibrio spp* parmi lequel le *Vibrio parahaemolyticus* est prédominant (53%) suivi par le *Vibrio cholerae* (47%)
- 54,2% en *Aeromonas* dont 25% constitué d'*A. hydrophila*, 22,5% *A. enteropelogenes*, 20% *A. caviae*, 15% *A. veronii* ainsi que *A. jandaei* et 3% *A. ichthiosmia*
- 42,4% en *Salmonella spp*, 13 sérotypes ont été identifiables dont *S. paratyphi B* (4,3%) et *S. montevideo* (4,3%) les plus pathogènes et *S. kiel* la plus fréquente (13%).

Pour les germes de dénombrement :

- Avec une prévalence de 93,20 % en *Pseudomonas spp*, les 46% sont constitués de *Pseudomonas aeruginosa*
- 88,1% en *E.coli* dont 48% sont largement supérieures à la norme
- 75% en BSR (Bactéries Sulfito-réductrices) dont 76% sont largement supérieures à la norme
- 100% en Entérocoques avec une moyenne de 4.10^6 ufc/ml et 82% supérieure à la norme.

Pour l'antibiogramme :

- Aucune antibioresistance n'a été noté pour les souches de *Pseudomonas*, *Enterococcus casseliflavus*.
- Pour les souches de *Salmonella* : Résistance aux mécilliname, ceftazidime, fosfomycine et cefoxitine
- *Aeromonas* : résistance à la colistine, aux fosfomycine, et ceftazidime
- Pour *Enterococcus hirae* : résistance aux Cefoxitine, fosfomycine, mécilliname, ampicilline
- Concernant les facteurs de pathogénicité des *Vibrios* : absence de *Vibrios* entéropathogènes

A part les germes recherchées et dénombrées, 28 autres types de germes ont été trouvées dont les plus importantes de point de vue pathogène sont :

- *Cronobacter sakazakii* rencontrées dans 6,80 %
- *Plesiomonas shigelloides*: 3,40 %
- *Edwardsiella tarda* : 5,1 %

Et les plus fréquentes : *Klebsiella pneumoniae*(30,50%), *Enterobacter cloacae* (30,50%), *Proteus vulgaris* (27,10%), *Shewanella putrefaciens* (27,10%), *Shewanella algae* (27,10%).

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

DISCUSSION

I. Originalité de l'étude

La sécurité alimentaire tient une place importante qui ne devrait être négligée dans la politique d'un Etat : selon la FAO, elle existe lorsque tous les êtres humains ont, à tout moment, un accès physique et économique à une nourriture suffisante, saine et nutritive leur permettant de satisfaire leurs besoins énergétiques et leurs préférences alimentaires pour mener une vie saine et active[47]. Dans les pays développés, l'institution chargée du suivi de la sécurité alimentaire en relation avec la santé publique mobilise une ligne budgétaire pour la sécurité alimentaire constituant une des plus onéreuse : au Nouvelle Zélande, ce cout s'est situé à 10 million de dollar en 2009[48]. Parallèlement à ce fait, les pertes financières provoquées par des épisodes de Toxi-infections alimentaires surtout collectives (TIAC) remontent un chiffre monétaire beaucoup plus important rien qu'en tenant compte des soins des personnes atteintes et le refoulement des produits suspects: pour les pays anglo-saxons, on a noté un cout de 75milliard de dollars en 2012 pour les quatorze pathogènes mis en cause aux Etats-Unis[49]. Au Nouvelle Zélande, ce cout s'élève à 162 millions de dollars tandis qu'il atteint les 1,5 milliard de livre sterling en Angleterre [48] ; par conséquent, maitriser les risques avant qu'ils ne surviennent est largement plus rentable que de les affronter une fois qu'ils deviennent des dangers.

La présente étude est une première renseignant les risques encourus à la consommation des poissons d'eaux douces à Madagascar et particulièrement la capitale. Bien que ces produits n'ont pas fait l'objet d'une intoxication alimentaire énoncée publiquement jusqu'à ce jour; les contextes et situations dans le pays c'est-à-dire l'absence d'inspection sanitaire ainsi que la commercialisation non contrôlée de ces produits en font qu'il y a peu de données les concernant, les lois en vigueur ne concernent que les produits d'exportation [45]. Les résultats obtenus dans la présente étude montrent bien que les poissons d'eaux douces ne sont pas des produits inoffensifs, salubres mais constituent un aliment à risque qu'il faut maitriser et ceci en révisant et appliquant les textes adéquates.

II. Discussion sur les résultats comparés à d'autres études

II.1 Discussion par rapport à la prévalence

Si le critère associé à l'analyse des *Vibrios* est une « absence dans 25g de produit », les résultats obtenus dans la présente étude (32,2%) dépasse largement cette norme. Bien qu'aucun critère spécifique n'est lié à l'analyse des *Aeromonas*, la prévalence observée est probablement très haute (54,2%) et peut présenter un risque majeur de danger chez les consommateurs. Etant des germes hydriques, les *Vibrios* et *Aeromonas* sont généralement rencontrés en milieu marin mais il a aussi été rapporté qu'ils vivent dans des eaux contaminées de déchets, ou de défécations humaines...par conséquent leur présence dans la présente étude remet certainement en question la qualité d'eaux d'où les poissons ont été pêchés. Cependant, lors d'une étude au Malaisie, une haute prévalence observée en *Vibrios* (98,7%) sur les poissons d'eaux douces analysés pourrait aussi être en relation avec la température des lacs ou rivières qui favoriserait la multiplication de ces bactéries[4]. Il faut remarquer que pour des études sur des poissons d'eaux douces, cette prévalence en *Vibrios* et *Aeromonas* varie considérablement en fonction du pays concerné, remettrait-il en cause la source des produits? Effectivement, lors d'une étude effectuée sur des poissons d'eaux douces et des poissons marins au Turquie en 2010 [50], la prévalence en *Vibrios* était de 0% et en *Aeromonas* de 10%, au Bagdad en 2014[51], celle de *Vibrios* était de 26% et l'*Aeromonas* de 15%, la Malaisie a montré la plus haute prévalence en *Vibrios* soit 98,7%. Pourtant, on ne peut pas se prononcer à l'unanimité que la haute prévalence est uniquement liée à cette source de produits étant donné que l'analyse ne s'était pas effectué depuis la source. Malgré que l'analyse statistique ait montré une différence non significative entre la prévalence en fonction de la catégorie des prélèvements analysés, l'absence en *Vibrio* ainsi que peu d'*Aeromonas* et *Pseudomonas* (en terme d'effectif) ont été constaté en élevage; la contrainte concernant la représentativité de cette catégorie (pour des raisons techniques, seul un site d'élevage a été analysé) reste une perspective afin d'argumenter l'hypothèse que les poissons issus d'élevage sont plus salubres que ceux qui se trouvent aux marchés.

Pour les *Pseudomonas*, même si un critère spécifique n'est lié au dénombrement de ce germe, la haute prévalence observée (93,2%), surtout pour *P.aeruginosa* (46%) et avec une moyenne de 3.10^2 UFC/ml pourrait constituer un risque de danger à la santé publique. Le *Pseudomonas* étant un germe hydrique, sa présence reflète majoritairement la qualité de l'eau dont les poissons sont issus malgré d'autres facteurs peu probables mais qui peuvent survenir dont le portage des manipulateurs ou une contamination croisée. La prévalence observée au Bagdad (15%) semble tolérable par rapport à celle trouvée dans la présente étude.

Concernant les *Salmonella* spp. , le critère associé étant une « absence dans 25g de produit », la prévalence obtenue dans la présente étude est très haute (42,4%). Compte tenu des réservoirs du *Salmonella* spp. (dans l'environnement, le sol et l'eau qui se contaminent par les matières fécales), la présence en *Salmonella* peut refléter la qualité d'eaux d'où les poissons ont été pêchés et/ou la qualité hygiénique du produit dépendant des manipulateurs (commerçants, pêcheurs). Dans la présente analyse statistique, la prévalence en fonction du période de prélèvement a montré une différence significative ($p= 0,03$): les échantillons prélevés en période de clôture de pêche présente 2,11 fois de risque d'être contaminés par du salmonella que les échantillons prélevés en période d'ouverture de la pêche reflétant par conséquent, les eaux originaires des poissons vendus en période d'ouverture diffèrent des eaux dont sont issus les poissons en période de clôture. Il faut toutefois noter que malgré que l'analyse statistique n'a pas montré une différence significative sur la prévalence en fonction des catégories des prélèvements et de leur présentation à la vente, les poissons issus d'élevage et ceux qui sont vendus sous-glace ne montraient pas de contamination en *Salmonella*, reflétant la probabilité d'une contamination via la manipulation. La qualité des poissons d'eaux douces en termes de contamination en *Salmonella* semble être satisfaite dans certains pays ((Latvia 2014) avec une prévalence de 0% [52]) mais reste encore un problème dans d'autres (39% au Bagdad, 39,9% en Arabie Saoudite et sur des produits congelés [53]).

Pour *E.coli*, les critères associés à leur dénombrement est de 10 germes/g[32], les prévalences obtenues lors de la présente étude présentent une haute prévalence d'échantillons à un nombre supérieur à cette norme (48%) et non seulement la prévalence globale est très haute (88,1%) mais le nombre moyen de germe par gramme est très élevé ($3,1 \cdot 10^5$ UCF/ml). La présence d'*E.coli* est un indicateur de contamination fécale, la haute prévalence observée dans la présente étude remet beaucoup en question la qualité d'eau dont les poissons sont issus. Il faut noter que pour l'élevage, le nombre d'*E.coli* dans les poissons avoisine les critères exigés (10 UFC /ml chez le Tilapia et 12 UFC /ml chez carpe) ce qui reflète que les poissons mis sur les marchés sont probablement issus d'eaux saumâtres mais il faut en outre ne pas négliger les conditions d'acheminement de ces produits depuis leur pêche jusqu'aux étales : en effet, si les poissons sont issus des lacs du pays comme le décrivent les commerçants, ils sont pour la plupart conditionnés dans des soubiques recouvertes de quelques herbes et peu de glaçons, n'éloignant pas dans ce cas une contamination en *Escherichia coli*. A noter que la contamination en *E.coli* ne diffère pas la catégorie marchés certifiés (grossistes, grandes surfaces,...) des marchés populaires.

Pour les BSR : les critères associé au dénombrement des BSR se situe à 10 ufc/g pour des poissons tranchés, panés ou non frais réfrigérés et de 2 ufc/g pour des poissons ou céphalopodes en entier. Par rapport à ces valeurs, le nombre observé dans la présente étude dépasse largement les limites maximales exigées : $4,5 \cdot 10^6$ ufc/g. Une étude effectuée au Togo sur des poissons fumés montrait une contamination en Bactéries Sulfito-Réductrices de 4,34%[54], or la présente étude rapporte une prévalence très élevée de 75% : même si les *Clostridium perfringens* constituent les BSR les plus dangereux, la haute prévalence observée n'écarte pas un risque sanitaire publique. Comme l'*E.coli*, les BSR constituent des germes témoins de contamination fécale par conséquent la haute prévalence observée est probablement relative à la qualité d'eau, le mauvais conditionnement ou acheminement, et /ou la manipulation.

Pour les entérocoques : la plupart des études effectuées pour la recherche ou dénombrement des entérocoques s'effectuent sur des eaux où le critère est de 0 UFC/ml si l'eau est destinée à être potable. Dans le recueil des textes sur l'élevage en vigueur dans le pays[32], le critère associé aux coquillages, oursins, bivalves présentés vivants

est de $2,5 \cdot 10^3$ /ml au maximum pour les streptocoques fécaux. Etant donné que c'est le mode même de l'élevage piscicole qui fait que les bassins sont enrichis par des sédiments, des déchets, des fientes pour nourrir les poissons..., il est normal d'observer des entérocoques chez les poissons cependant un nombre tellement élevé ($4 \cdot 10^6$ ufc/ml) indique un point d'eau trop abusé en déchets organiques. Néanmoins, la catégorie élevage (cat I) et quelques points dans la catégorie des marchés certifiés (catII) ont montré un nombre d'entérocoques assez tolérant : une centaine en élevage et voisine de 300 UFC/ml dans certains points de vente certifiés. Au Bagdad, les poissons analysés révélaient une prévalence en *Streptococcus* groupe, certes considérable (49%) mais reste encore inférieure que celle de la présente étude.

Tous ces germes témoins de contamination fécale : *E.coli*, *Entérocoques*, BSR et même *Pseudomonas* reflètent la qualité des eaux dont sont issus les poissons d'eaux douces dans les marchés de la ville d'Antananarivo, leur conditions d'acheminement ou de leur manipulation.

II.2. Discussion par rapport à la variété d'espèces

Pour les *Vibrios* :

Généralement, ce sont les *V.parahaemolyticus* qui sont isolés des eaux et surtout d'eaux marines, l'observation de *V.cholerae* dans la présente étude est assez dangereux de point de vue risque sanitaire (elles sont rencontrées dans les eaux usées le plus souvent); toutefois plusieurs études ont été établies afin de débattre la transmission du choléra chez les consommateurs via du poisson contaminé. Toutes ces études ont montré que les preuves restent insuffisantes pour déduire que *V.cholerae* chez les poissons puissent être à l'origine de choléra chez l'homme ; à côté de cela, aux Philippines, des études épidémiologiques en 1961 [55] ont été établies et rapportaient que l'épidémie de choléra observée dans le pays avait pour étiologie des crevettes crues. D'autres études montrent que *V.cholerae* survit dans les poissons et les fruits de mer pendant 2 à 5 jours à la température ambiante et pendant 1 à 2 semaines sous réfrigération[56].

Aussi bien pour les *Aeromonas* que pour les *Pseudomonas*, les espèces les plus pathogènes sont les plus fréquentes ce qui augmentent les risques et dangers tandis que

pour les *Salmonella spp*, malgré une haute prévalence observée, les sérotypes les plus pathogènes fréquemment rencontrées ne sont que *S.paratyphi B* et *S.montevideo* et qui restent toutefois à faible prévalence.

II.3 Discussion par rapport à la pathogénicité

L'antibiorésistance est un critère très essentiel dans la bactériologie car plus une bactérie est multirésistante, plus il est difficile de la combattre.

Pour l'antibiorésistance des *Aeromonas* :

L'antibiorésistance des *Aeromonas* dépend du type de produit d'où le germe a été isolé : lors d'une étude sur des *Aeromonas* isolés à partir du fèces de porc, une résistance au pénicilline a été notée, or pendant une étude sur deux lacs, les 104 souches d'*Aeromonas* isolées étaient résistantes au tetracycline 14%, à l'acide nalidixique 59% , au fosfomycine 8%, au tobramycine et cotrimoxazole 7%, cefotaxime 4%, chloramphenicol 2%, gentamicine 1% ce qui n'éloigne pas trop des résultats obtenus dans la présente étude : colistine (20,70-55,70), en Fosfomycine (3,9-31,7), Ceftazidime. Etant des germes opportunistes, le changement de ces caractéristiques pourrait y être relatif mais il ne faut pas les négliger pour autant; une des flores aquatiques commensale du poisson, une étude a montré que la présence de l'AgK (antigène K), responsable de la pathogénicité de *A.hydrophila* est négative chez le poisson [57].

Pour l'antibiorésistance des Salmonelles :

Une étude sur des poissons d'eaux douces effectuée en Arabie Saoudite rapportait que sur 16 antibiotiques testés, les souches de *Salmonella* chez les poissons étaient résistants au Tétracycline (70%), puis à l'ampicilline (70%) et à l'amoxicillin+ acide clavulanique (45%). Parmi ces antibiotiques, seule l'ampicilline a été utilisée dans la présente étude, et qui n'a pas donné un signe de résistance. Les résistances rencontrées dans la présente étude étant vis-à-vis du Mécilliname, de Ceftazidime, de Fosfomycine et Cefoxitine ; une étude effectuée en Argentine a pu parlé de résistance au Mecilliname mais ceci en modifiant quelques structures de la souche [58].

Entérocoques : les entérocoques sont des bactéries fréquemment résistantes aux antibiotiques, leur classement même en font qu'il y a des Entérocoques résistant au Béta

Lactamines (ERB) et celles qui résistent à la Vancomycine (ERV) pour les principaux mais bien d'autres types de résistance. Une étude sur l'antibiorésistance des bactéries fécales et autochtones dans des rivières et station d'épuration ont montré qu'en moyenne plus de 40 % des *Escherichia coli* et plus de 80 % des entérocoques intestinaux résistent à au moins l'un des antibiotiques testés [59].

Les antibiorésistances observées reflètent probablement une contamination des produits lors de la manipulation étant donné que ce ne sont pas des résistances naturelles de chaque germe concerné

Les *Vibrio cholerae* et *parahaemolyticus* comprennent plusieurs sérotypes dont seuls sont pathogènes ceux qui sont hémolytiques (sérotipe O1 et non O1 pour *V.cholerae*), lesquels sont rarement rencontrés dans les cas sauvages. Forte heureusement, la haute prévalence en *Vibrios* obtenue dans la présente étude ne concernait pas de « *Vibrios non entéropathogènes* » étant donné la négativité à 100% des facteurs de pathogénicité.

II.4 Discussion par rapport à la caractérisation d'autres germes

Parmi la famille des *Entérobactériaceae*, *Cronobacter sakazakii* est une bactérie reconnue dans sa pathogénicité en néonatale, sa recherche est toujours une exigence dans les produits infantiles tels que poudres de lait, les concentrés en lait, ...Ce germe peut provoquer des maladies dangereuses chez le nourrisson ou enfants tels que les méningites et d'autres affections nerveuses. L'observation de la bactérie dans la présente étude constitue une menace potentielle qui mérite un suivi de près ; heureusement, les poissons ne constituent pas une alimentation fréquente des enfants, toutefois les adultes doivent en prendre des précautions.

Le *Plesiomonas shigelloides* est une bactérie, autrefois classée dans la famille des *Vibrionaceae* mais actuellement parmi les *Enterobacteriaceae* ayant comme habitat naturel l'eau présentant une pathogénicité assez importante pour l'homme. Cette bactérie a fait des épisodes de gastro-entérite aigue dans plusieurs pays dans les dernières décennies, tous isolés à partir de poissons et il est à noter qu'elle est même épidémique pour les pays tropicaux. Au Japon, 47,8% de fèces isolés de Cormorans ont été contaminés en *Plesiomonas shigelloides*, les souches étant résistantes à l'ampicilline(93.9%), tétracycline (6.1%) et triméthoprime (3.0%), l'étude prévenait les

risques encourues à la santé publique [60]. Si le germe est généralement reconnu comme à l'origine de gastro-entérite principalement, un premier cas de méningo-encéphalite néonatale dont l'origine est *Plesiomonas shigelloides* a été noté en Chine [60], aggravant de plus en plus la pathogénicité de cette bactérie.

Edwardsiella tarda est une bactérie parmi les plus pathogène chez les poissons. Étant proche de la *salmonella*, elle est de caractère opportuniste tandis que l'autre est d'emblée pathogène. La bactérie est responsable d'une maladie appelée « Edwardsiellose » chez les poissons, les signes cliniques en sont presque pareils que pour les vibrioses et les aéromonoses.

A part ces 3 bactéries, bien que les autres listes trouvées soient des germes banales de contamination (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *proteus*), elles méritent tout de même une considération car peuvent devenir pathogènes. Particulièrement pour *Shewanella putrefaciens*, elle est souvent l'indicateur d'une putréfaction ou altération du produit, pour *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*, elle a été isolée à partir d'insectes à travers laquelle, cette dernière peut provoquer une myiase. L'isolement de cette bactérie dans la présente étude peut s'expliquer par le fait qu'à la vente, les produits ne sont soumis à aucune protection particulière par conséquent les mouches peuvent s'y déposer facilement.

III. Limites de l'étude et situation du commerce des poissons d'eaux douces

Si le niveau de contamination des poissons d'eaux douces a pu être énoncé lors de la présente étude, la source en reste une problématique. Généralement, on peut classer la source de la contamination à 3 niveaux :

- Depuis la source : c'est-à-dire l'eau dont sont issus les poissons
- Lors du transport : les conditionnements et température d'ambiance
- La manipulation

✓ Depuis la source

Les *Vibrios* étant principalement des flores aquatiques, la haute prévalence observée est majoritairement liée à la source des produits c'est-à-dire l'eau dont sont issus les poissons. Pourtant, bien que les échantillons issus d'élevage n'ont pas montré de contamination en *Vibrios*, il est difficile toutefois de prononcer que les poissons d'élevage soient salubres étant donné que la taille d'échantillons de cette catégorie est trop faible (pour de contraintes de terrain) ; toutefois étant donné que les analyses statistiques montrent que la différence de prévalence entre la catégorie II (marchés certifiés) et la catégorie III (marchés populaires) est non significative, cela indiquerait il que leur produits seraient ils issus d'une même source... ? Particulièrement pour la contamination en *Salmonella spp* laquelle la prévalence est accentuée en période de clôture de pêche, cette différence pourrait être liée à une source différente (effectivement, en période de clôture de la pêche, ce sont les poissons issus des étangs périphériques qui devraient être retrouvés sur les marchés) mais peut aussi être liée à la saison de pluie où les effluents pourraient perturber l'équilibre des eaux. En outre, il faut admettre que les commerçants ne révèlent pas et de leurs souvent la source de leurs produits soit mentent à ce sujet ou sont eux même victimes des revendeurs.

✓ Lors du transport

Il faut tenir compte que depuis la source où les commerçants ou grossiste font la cueillette ou pêche des poissons, ces derniers sont conditionnés dans des soubiques recouverts de quelques herbes et transportés dans des transports communs avec « peu ou sans glaçons ». Ces paramètres de transport et de conditionnement pourraient probablement être l'étiologie des contaminations et surtout celle fécale. Dans la présente étude, les échantillons issus d'élevage piscicole ont tout de suite été mis en sachet stérile après pêche et transportés sous glace, probablement une des causes pour laquelle les poissons issus de cette catégorie n'ont montré ni une contamination en *Salmonella* ni en *Vibrios*. Le transport et les conditionnements sont des paramètres très importants qui pourraient constituer des points critiques à l'origine de contamination.

✓ Manipulation

Les poissons mis sur les marchés sont juste rincés sans être écaillés, éviscérés ou autre préparation particulière puis étalés soit sur table recouvert d'un sachet qui ne se change presque pas qu'après usure soit sur une table carrelée nettoyée avec juste de l'eau. Pour les deux cas, la plupart des commerçants n'utilisent guère de « blouse » pendant la vente, les matériels qu'ils n'utilisent (seau, éponge, couteau, etc ...) ne sont ni nettoyés convenablement à l'eau savonneuse, ni désinfectés ou stérilisés. Toutes ces situations occasionnent une contamination surtout en *Salmonella* ; bien que les échantillons issus des grandes surfaces (présentés sous glace, écaillés et éviscérés) n'aient pas présentés une contamination en *Salmonella*, on ne peut se prononcer que les poissons issus de grande surface sont salubres étant donné qu'une fois de plus, la taille d'échantillon issue de cette catégorie est trop faible ce qui constitue une des limites de la présente étude, cette contrainte est pourtant presque irréparable actuellement étant donné que seules une grande surface parmi tant d'autres commercialise le produit.

IV. Recommandations

Tous les résultats issus de cette étude remettent en question la santé publique surtout vis du contexte dans le pays où il n'y a pas d'inspection sanitaire pour les produits d'eaux douces. Sur ce fait, plusieurs recommandations sont à prescrire aussi bien depuis la source qu'aux conditionnements jusqu'à l'étalage :

Depuis la source :

- L'Etat devrait instaurer une entité responsable de la surveillance des marais interdits pour empêcher les pêches illicites dans ces endroits.
- Appuyer les élevages piscicoles pour développer et aider les pisciculteurs qui sont des paysans pour la plupart. Recenser les petits ou grands élevages et les certifier comme source de produits en plus de ceux qui sont issus des lacs.

Conditionnement :

- Mettre en place des conditions d'acheminement adéquates pour le circuit des produits : camions frigorifiques ou du moins récipients adéquats (glacière)

respectant un ratio poissons/glace adéquat depuis la source jusqu'aux marchés grossistes ou détaillant.

- Inspecter ces conditionnements au moins aux marchés mais pendant les transports si possibles.

Etalage :

- Certifier les marchés vendant le produit et les contrôler : leurs sources de produits doivent être informés et correspondre à la liste des lacs ou élevages certifiés. Chaque vendeur doit avoir une traçabilité bien décrite de l'origine de ces produits, un local adéquat pour la vente (local carrelé, sous glace,)
- Inspecter les poissons à l'étalage et appliquer les « saisies » en cas de non-conformité.
- Avis aux consommateurs : même si les autorités ne sont pas mises en place, certaines précautions facilement praticable permettraient une protection pour les consommateurs : il est fortement déconseillé de manger des poissons d'eaux douces mal cuites, respecter les hygiènes.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'hypothèse énoncée dans la réalisation de cette étude a été vérifiée : effectivement, les poissons d'eaux douces commercialisés dans la ville d'Antananarivo sont très contaminés voire trop contaminés en termes de qualité microbiologique. Malgré que certaines de ces bactéries ne semblent pas pathogènes et que d'autres en nécessitent encore la confirmation, des mesures doivent être entreprises pour sauvegarder ou prévenir le risque à la santé publique. L'observation de ces quelques résistances aux antibiotiques doit être prise en considération pour d'éventuelles luttes, en effet, les risques étant évoqués dans cette étude, les mesures ou moyens de maîtrise restent à mettre en œuvre. Ces mesures doivent être établies par tout secteur concerné de la filière : Etat, inspecteurs à mettre en place depuis la pêche jusqu'au marchand, à chaque point stratégique, il y aura un responsable chargé de la surveillance.

Bien que la présente étude ait pu évoquer certains aspects concernant la qualité microbiologique des poissons d'eaux douces, beaucoup de questionnements nécessitent encore des réponses notamment la pathogénicité des *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Edwardsiella*, les qualités microbiologiques de point de vue virale mais surtout une comparaison depuis la source des poissons (lacs) jusqu'aux marchés et plusieurs échantillons d'élevage car si la qualité microbiologique est énoncée, l'origine reste incertaine : est-ce que les poissons trouvés sur les marchés sont issus de lacs insalubres ou est-ce le conditionnement ou la manipulation ou les poissons mêmes qui sont le réservoir de flore bactérienne : une étude en amont et à l'aval doit être effectuée afin de situer dans quel niveau de la chaîne existe-t-il la contamination ? Comme perspectives, il faudrait faire la descente sur terrain auprès des grands lacs afin d'y prélever des poissons et faire l'analyse parallèlement avec les produits du marché et des élevages périphériques en considérant les conditionnements communs aux commerçants et ceux qui sont adéquats. La filière pisciculture est une filière très intéressante qui mérite d'être développée et professionnalisée : chaque entité devrait définir ses parts de responsabilités pour y parvenir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. FAOSTAT. Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. FAOSTAT ; 2012.
[EN LIGNE]. [consulté le 11/05/16]. Disponible sur :
<http://www.fao.org/news/story/fr/item/423152/icode/>
2. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Directives pour l'inspection du poisson fondée sur les risques. Etude FAO Alimentation et Nutrition. Rome; 2009. p. 95.
3. Centre WorldFish-Egypte. Le poisson et la sécurité alimentaire en Afrique. Egypte; 2011.
4. Ahmad N, Ghazali FM, Cheah YK, Son LR. Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. Int J Food Research. 2011(18):689-95.
5. Ministère de la Pêche. Diminution de la consommation des poissons d'Antananarivo. L'express Mada; 2015.
6. Randrianarisoa GTV. La commercialisation des poissons d'eau douce frais à Antananarivo ville [Mémoire]. Gestion: Antananarivo : Université d'Antananarivo; 2004.74p.
7. Rafenoharisoa M. Toxi-infections alimentaires collectives à Madagascar janvier 2009-juin 2011.Direction de la veille sanitaire et de la surveillance épidémiologique; 2011.
8. Dossin JL. Les espèces primitives de la Terre. GEOPEDIA ; 2013.[EN LIGNE]. [Consulté le 02 juillet 2016].Consultable à l'URL : <http://www.géopedia.fr/>

9. Giacomo BVP, Gérard C, Haschemeyer A, Bernardi G. ADN et Taxonomie des poissons. Paris Cédex: Laboratoire de Génétique moléculaire, Institut Jacques Monod ; 2005.
10. Yahyaoui A. Phylum des chordes (chordata): Systématique des" poissons". Faunistique et Physiologie animale. Faculté des Sciences de Rabat; 2014. p. 75.
11. Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Consommation des poissons, mollusques et crustacés: Aspects nutritionnels et sanitaires pour l'Homme. Maisons-Alfort Cedex; 2010.
12. Kiener A. Poissons, pêche et pisciculture à Madagascar. France: CTFT; 1963.
13. Derham PH. Poissons des eaux intérieures de Madagascar. Biogéographie de Madagascar ;1996:423-40
14. Therezien Y. L'introduction de Poissons d'eau douce à Madagascar, leur influence sur la modification du biotope. Bull fr pêche piscic. 1960;33(199):61.
15. Rasoarahona JRE. Lipides de poissons d'eau douces de Madagascar: Identification des acides gras particuliers et évolution du profil de leur composition chez *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis macrochir*, *Tilapia rendalli*, *Tilapia zillii* et *Arius madagascariensis*. Application à la différenciation de ces espèces en fonction de la saison et/ou de l'origine [Thèse]. Sciences: Antananarivo; 2004.213p.
16. De Neufbourg MLC. La pratique d'élevage de la carpe. Kmae-journal. 1932: 218-20.
17. Streams O. Espèces envahissantes: Cyprin doré. Ontario; 2012.

18. OCDE/FAO (OCDE). Perspectives et de l'OCDE de la FAO 2015-2024. Paris: OCDE; 2015.
19. Haard NF. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Int Food Res J*. 1992;25(4):289-307.
20. Kim K, Haard NF. Degradation of proteoglycans in the skeletal muscle of pacific rockfish (sebastes sp.) during ice storage. *J Muscle Foods*.1992;3(2):103-21.
21. Thierry E. Maladies virales animales. Université de Liège; 2011.
22. Office International des Epizooties (OIE). Code sanitaire pour les animaux aquatiques: Chapitre 10.4: Nécrose hématopoiétique infectieuse. OIE; 2010. p. 1-8.
23. Université de Liège. Veterinary Virology and animal viral Diseases. Veterinary Medicine: Departement of infectious and parasitic diseases ; 2011.
24. Kinkelin, Gay M. La Tetracapsulose à *Tetracapsula bryosalmonae*: une bonne cible pour des études épidémiologiques an ichtyopathologie. *Epidémiol et santé anim*. 2000;38:7-18.
25. Carlier V. Analyse et maitrise des risques dans les industries agroalimentaires: Fiches dangers microbiologiques;2010.
26. Département Vétérinaire Rhône Mérieux de Lyon. Vaccin contre la vibriose des poissons. *Kmae-journal*.1984: 1(292)46-7.
27. FAO. Hygiène des poissons et des fruits de mer. Rome. FAO;1974. 59p
28. Austin B, Austin D. *Bacterial Fish Pathogens*.2 ed. New York: Ellis Horwood; 1993.

29. Orieux N. Quantification et prévalence de *Flavobacterium psychrophilum* chez les truites arc-en-ciel d'aquaculture ; relation hôte-pathogène et réponse immunitaire [Thèse]. Géochimie et écotoxicologie: Bordeaux; 2011.
30. CUQ JL. Microbiologie alimentaire: les relations micro-organismes/aliments/consommateurs, les maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments, les agents antimicrobiens. STIA Montpellier; 2007.
31. Choi JY, Sifri C, Goumnerov B, Rhame LG, Ausubel FM, Calderwood SB. Identification of virulence genes in pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. J Bactériol. 2002;184(4):952-61.
32. Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche. Recueil des textes législatifs et réglementaires. Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche 2005. p. 539-660.
33. Altekruse SF. Control strategies for *Salmonella enteritidis* in five countries. Food Control. 1993; 4:10-6.
34. Clements A, Joanna C, Young, Frankel G et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut microbes. 2012:322.
35. Num H. Bactérie Biologie.CNRTL Nancy Cedex. 2012.
36. Marchand G. Méthode de laboratoire: Méthode analytique 368: Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate. Québec: irst; 2011.
37. Université de Lyon. Les milieux de culture en bactériologie. [EN LIGNE]. Département de microbiologie.2012.[Consulté le 02 Septembre 2016].Consultable à l'URL : [www. dmipfmv.ulg.ac.be/./milieux.doc](http://www.dmipfmv.ulg.ac.be/./milieux.doc))

38. Fenselau C, Demirev P. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001 Jul-Aug; 20(4):157–71.
39. Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. Identification bactérienne de routine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Lille : impact médical et économique. Agence nationale de la sécurité sanitaire (Anses); 2011.
40. Rao PS. Polymerase Chain reaction (PCR). Département Microbiology; 2006.
41. Descours G. Diagnostic des infections bactériennes: quelle place pour la biologie moléculaire ? Centre de Biologie Est DUCIV; 2014.
42. Ministère de l'Environnement et des Forêts. Tableau de bord environnemental Région Analamanga. Office national pour l'environnement. Ministère de l'Environnement et des Forêts; 2012.
43. McDonald J. Handbook of Biological Statistics. 2nd ed. Maryland: Sparky House Publishing; 2009.
44. IPM (Institut Pasteur de Madagascar). Mode opératoire: Traitement des analyses (Aliments). IPM ; 2014.
45. Ministère de l'Agriculture, de l'élevage et de la Pêche. Les critères microbiologiques et le plan d'échantillonnage officiel applicables aux produits de la pêche et de l'aquaculture destinés à la consommation humaine en vue de l'exportation. Ministère de l'Agriculture, de l'élevage et de la Pêche ; 2009. p. 15.
46. CA-SFM (Société française de microbiologie). AntibioGramme vétérinaire. Paris: Société française de microbiologie; 2015.
47. FAO. Sécurité alimentaire: l'information pour l'action. Guides pratiques. FAO. 2008.

48. Gadiel D, Abelson P. The economic cost of foodborne disease in New Zealand. Sydney. Applied Economics Pty Ltd; 2010.
49. Hoffmann, Sandra, Batz MB, Morris, Glenn J. Annual cost of illness and quality adjusted life year losses in the United States due to 14 Foodbornes. J Food Prot. 2012; 7(11): 1184-358,292-302.
50. Yucel N, Balci S. Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. J Food Prot. 2010;2(73):380-4.
51. Maysoon SA. Isolation of bacteria from fish: Zoonotic diseases unit veterinary medicine University of Baghdad Iraq. Int J Adv Res.2014; 2(3): 274-9.
52. Terentjeva M, Eizenberga I, Valcina O, Novoslavskij A, Strazdina V, Berzins A. Prevalence of Foodborne Pathogens in Freshwater Fish in Latvia. J Food Prot. 2015;11(78):2093-8.
53. Elhadi N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. Asian Pac J Trop Dis. 2014.
54. Kokou A. Evaluation de la qualité microbiologique des poissons fumés artisanalement au Togo. Dakar: Université Cheiki Anta Diop de Dakar; 2010.
55. Joseph PR, Tamayo JF, Mosley WH. Studies of cholera El Tor in the Philippines. Bull of the world. 1965;33(5): 627-36
56. De Araoz. Principes et méthodes de la lutte contre le choléra. Cahiers de la santé publique. Genève OMS; 1970.

57. De Meuron P, Peduzzi R. Caractérisation des souches du genre *Aeromonas* isolées chez des poissons d'eau douce et quelques reptiles. *Zbl Vet Med B* 1979; 26(2): 153-67.
58. Hall RM. Salmonella genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol.* Oct 5(10):1525-38.
59. Servais P, Garcia-armisen T, Georges I, Billen G. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modeling. *Science of The Total Environment*. 2007; 375(1-3):152–67.
60. Matsuyma R, Kuninaga N, Morimoto T. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from great cormorants (*Phalacrocorax carbo hanedae*) in Gifu and Shiga Prefectures, Japan. *J Vet Med Sci*. 2015; 77(9):1179-81.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiches de collecte des données

I. Renseignements sur les prélèvements

IDENTIFICATION (n° au labo)	LIEU DE COLLECTE	DATE ET HEURE DE PRELEVEMENT	HEURE ET TEMPERATURE A LA RECEPTION	ESPECE	DESCRIPTION (entier/morceau)	NOMBRE
--------------------------------	------------------	------------------------------	-------------------------------------	--------	---------------------------------	--------

II. Fiche des cultures bactériologiques

Date :

Prélèvement N° : Recherche *Vibrios*

Id	Colonies	Gram	MALDI	PCR	Colonie	Gram et	MAL
échantillon.	caractéristiques (mauve et bleu sur ChromAgar Vibrio et jaune sur TCBS	et oxydase			non caractéristique	oxydase	DI

Date :

Prélèvement N° :

Recherche : Salmonella

Id Ech.	isolement		Colonies caractéristiques (mauve sur S+ et noir avec halo sur SS)	Gram et oxydase	MAL DI	Colonies non caractéristiques	Gram et oxydase	MA LDI
	R	S+						
	M	S+						
	R	SS						
	M	SS						
	R	S+						
	M	S+						
	R	SS						
	M	SS						

Date :

Prélèvement N° :

Dénombrement : *E.coli*

Id échantillon.	Lieu d'origine	Colonies caractéristiques (Bleues)			
		Nombre SM	Nombre -1	Nombre -2	Nombre -3

Date :

Prélèvement N° :

Dénombrement Pseudomonas :

Id éch.	Colonies caractéristiques	Gram et oxydase	Colonies non caractéristiques	Gram et oxydase	MALDI
	Nb SM	Nb	-1		

Date :

Prélèvement :

Recherche : *Aeromonas*

Id echantillon	Colonies caractéristiques (Bleu, blanc centré bleu et rose sur Chromagar Vibrios S+)	Gram et oxydase	MALDI

Date :

Prélèvement :

Dénombrement : BSR

Id éch.	Colonies caractéristiques (noires)					MALDI
	BB	Nombre -1	Nombre -2	Nombre -3	Nombre - 4	

Date :

Prélèvement :

Dénombrement : entérocoques

Id échantillon.	Colonies caractéristiques (noires)					MALDI
	Nombre SM	Nombre -1	Nombre -2	Nombre -3	Nombre -4	

Annexe 2 : Fiche paillasse d'extraction d'ADN bactérien

Annexe 3 : Fiche paillasse des analyses au PCR

Annexe 4 : Fiche paillasse résumant le sérotypage des Salmonelles

EXTRACTION d'ADN bactérien à partir de souches pures – Méthode Chelex 100_Persson 2005

Date : 27/01/2016

Manipulateur : RF

Observateur :

Mettre l'Instagene sur un agitateur magnétique pour suspendre les billes de gels de chelex

NB: colonie piquée sous hotte flux laminaire avec oèse plastique stérile

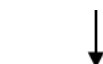
Ep 2ml/ 1,5ml

+

200 µl Chelex

2 ou 3 UFC de culture
18-24H

Mélanger avec oese



Bouillir 8-10 min, 100°C



20000g, 10 min, 4°C

Surnageant = ADN prêt à l'emploi

Préparation du Chelex pour extraction d'ADN bactérien

Conserver à -20°C ou -80°C

N° Tube	N° extrait LES	N° souches LHAE
1	D0633 A	62 2A
2	D0634 A	62 1A
3	D0635 A	15 1 A
4	D0636 A	16 2 A
5	D0637 A	15 1 alg
6	D0638 A	62 2bl
7	D0639 C	64 1C
8	D0640 C	61 1 C
9	D0641 C	63 1 C
10	D0642 P	17 2 P
11	D0643 P	13 2P
12	D0644 P	15 1 P
13	D0645 P	62 2 P
14	D0646 F	62 1 F
15	D0647 F	13 1F

Designation	quantité	quantité pour un flacon Instagene
Chelex	10 g	2g
Tris/Hcl 10mM	100mL	20mL
EDTA 10mM, pH8	10mL	2mL
Chelex 10%(w/v), Tris Hcl 10mM, EDTA 1mM, pH		

Manipulateur: RF

Date : 05/02/2016

040-TV42-035_RF

Extraction de l'ADN bactérien selon méthode Instagene							
Témoins CNRV Thermocycleur BIOMETRA T3000 - LES							
N° PCR	Echantillons	n° origine	N°lot/date	Résultats	Dilution	[ADN] µg/µl	[ADN] µg/2,5µl P.E. par réaction PCR
1	T(+) 2086	96-T1 GNA p2			3,6E1		0
2	EDS						
3	C1368						
4	C1491						
5	C1370						
6	C1372						
7	C 1361						
8	EDS						
9	C1495						
10	C1500						
11	C1506						
12	C1507						
13	DO 642						
14	EDS						
15	DO 643						
16	DO 644						
17	DO 645						
18	C 1308						

MIX PCR pour volume réactionnel de 25 µl et prise d'essai de 2,5µl

Vol (µl) / 1tube	Vol pour n (+1) tubes	[] finale		
		N°Lot/date	29	
11,3	H2O qualité PCR		339	
2,5	Tampon d'amplification 10 X sans15 mM MgCl2		75	Tampon 1 X sans MgCl2
1	MgCl2 50 mM		30	2 mM MgCl2
2,5	dNTPs 2 mM chacun		75	200 µM de chaque dNTP
2,5	Primer-mix L-tdh et R-tdh - 10 µM chacun		75	1 µM de chaque primer
2,5	Primer-mix L-trh et R-trh - 10 µM chacun		75	1 µM de chaque primer
0,2	PlatinumTaq Polymerase (Invitrogen)		6	1U/ 25 µl volume réactionnel
22,5	Total		675	
		entrée	sortie	

Manipulateur : RF
Date : 22/02/2016

055 - TV3 - 052 RF

Extraction de l'ADN bactérien selon méthode Instagene et chelex

Témoins CNRV - Thermocycleur BIOMETRA T3000 - LES							
N° PCR	Echantillons	n° origine	Résultats	n°Lot/date	Dilution	[ADN] µg/µl	[ADN]= µg/2,5µl P.E. par réaction PCR
1	T(+) 1023	Vchol Cbc			4,8E2		
2	T (+)DO639				E0		
3	EDS						
4	C1309				E0		
5	C 1310				E0		
6	C1488				E0		
7	C1288				E0		
8	EDS						
9	DO 864				E0		
10	DO 865				E0		
11	DO866				E0		
12	DO867				E0		
Heure	entrée	sortie					

Salle MIX

En bac à glace ou portoir réfrigéré

MIX PCR pour volume réactionnel de 25 µl et prise d'essai de 2,5 µl

Vol (µl) pour 1tube	Vol pour n (+0,2) tubes			[] finale
		N°Lot/date	12	
12,25	H2O qualité PCR		149,45	
2,5	Buffer B 10 X sans 25 mM MgCl ₂		30,5	Tampon 1 X sansMgCl ₂
2,5	MgCl ₂ 25mM		30,5	2,5 mM MgCl ₂
2,5	dNTPs 2 mM chacun		30,5	200 µM de chaque dNTP
2,5	Primers VCF et VCMR - 10 µM chacun		30,5	1 µM de chaque primer
0,25	Firepol DNA Polymerase 5U/µl (Solis BioDyne))		3,05	1,25 U/ 25 µl volume réactionnel
22,5	Total		274,5	
	entrée	sortie		
Heure				

Salle Pre-PCR

Mettre une surblouse et des gants

Ajouter sous hotte	Vol (µl) par tube	tube de réaction PCR	dans la glace pilée
	2,5	Ajout extrait ADN ou témoin	Changer de pointe stérile cotonnée fermer le tube et pulser
	22,5	Mix PCR pré-distribué	
	25	volume réactionnel / tube PCR	

	entrée	sortie
Heure		

Transporter dans la glace vers la salle Amplification

Salle PCR/POST

Placer les tubes dans l'appareil Biometra T3000 ou Biometra Tgradient

Verrouiller sur position tubes (cran à droite)

Programme :	VcVM	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation		95°C	5 min
			1

Manipulateur : RF

Date : 03/02/2016

031 - TV3 - 033 RF

Extraction de l'ADN bactérien selon méthode CNRV ou Instagene

Témoins CNRV - Thermocycleur BIOMETRA T3000 - LES

N° PCR	Echantillons	n° origine	Dilution	[ADN] µg/µl	[ADN]= µg/2,5µl P.E. par réaction PCR
1	T(+) 1023	Vchol Cbc	4,8E1		
2	EDS				
3	C 1371		E0		
4	C1376		E0		
5	C1507		E0		
6	EDS				
7	DO639		E0		
8	DO640		E0		
9	DO641		E0		
10	EDS				
11	DO646		E0		
12	DO647		E0		

Salle MIX

MIX PCR pour volume réactionnel de 25µl et prise d'essai de 2,5 µl

Vol (µl) pour 1tube	Vol pour n (+0,2) tubes			[] finale
		N°Lot/date	12	
12,25	H2O qualité PCR		149,45	
2,5	Buffer B 10 X sans 25 mM MgCl2		30,5	Tampon 1 X sans MgCl2
2,5	MgCl2 25 mM		30,5	2,5 mM MgCl2
2,5	dNTPs 2 mM chacun		30,5	200 µM de chaque dNTP
2,5	Primers CTX2 et CTX3 - 10 µM chacun		30,5	1 µM de chaque primer
0,25	Firepol DNA Polymerase 5U/µl (Solis BioDyne)		3,05	1,25 U/25 µl volume réactionnel
22,5	Total		274,5	

Salle Pré-PCR

Mettre une surblouse et des gants

Ajouter sous hotte	Vol (µl) par tube	tube de réaction PCR	dans la glace pilée
	2,5	Ajout extrait ADN ou témoin	Changer de pointe stérile cotonnée fermer le tube et pulser
	22,5	Mix PCR pré-distribué	
	25	volume réactionnel / tube PCR	

Transporter dans la glace vers la salle Amplification

Salle PCR/POST - Biometra T3000

Lancer le programme CTXA

Programme	CTXA	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	5 min	1
Amplification	Dénaturation	95°C	25
	Hybridation	62°C	
	Polymérisation	72°C	
Elongation finale	72°C	10 min	1
Réfrigération	4 °C	∞	

Salle PCR/Post-PCR

Electrophorèse : Gel Agarose 1,5 % - TBE 1X, 100 V, 40 mn

Portoirs et Boîte à glace à décontaminer dans Eau de Javel 5 %

taille amplicon = 564 pb

INSTITUT PASTEUR DE MADAGASCAR-LHAE
SEROTYPAGE DES SALMONELLES-FEUILLE DE SAISIE DES RESULTATS

Date :

Visa technicien :

Référence de la souche :

Identification biochimique :

Souche auto-agglutinable : Oui ☐

Non ☐

Sérotypage (saisir positif : + ; négatif : -)

OMA	OMB	OMC	OMD	OME	OMF	OMG						
OMA	1,2	4,5	9	3,10,15	10	15	1,3,19	vi				
OMB	6,7,8	7	8	11	13,22,23	6,14,24						
HMA	HMB	HMC	HMD									
HMA	a	b	C	d	i	Z10						
HMB	HE	h	x	z15	HG	g,m	g,p	m	p	g ,s,t	s	T
HMC	k	y	z	HL	v	w	Hz4	r				
H1	2	5	6	7								

Phase II : Inversion de phase

- ☐ Non
- ☐ Oui SG

HMA	HMB	HMC	HMD									
HMA	a	b	c	d	i	Z10						
HMB	HE	h	x	z15	HG	g,m	g,p	m	p	g ,s,t	s	t
HMC	k	y	z	HL	v	w	Hz4	R				
H1	2	5	6	7								

RESULTAT : Formule antigénique :

Sérovar :

Visa Technicien :

Visa du responsable technique :

REDACTEUR : E .RAJAOMIARISOA (11 /02 /14) MO G005 /01	VERIFICATEUR : N .RAVAONINDRINA (12 /02 /14) Version : 3	APPROBATEUR: A.BASTARAUD (10 /10 /14) Date d'application : 31 /10/14
-------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------

Annexe 5 : Figures des espèces de poissons : Tilapias, Carpes, Cyprin doré et Fibata



Mélanger avec oese



amplicon 300 pb Firepol DNA polymerase (Solis BioDyne)
Vibrio cholerae vs mimicus (V3) L.E.S
L.E.S



VELIRANO

« Eto anatrehan'i ZANAHARY, eto anoloan'ireo mpikambana ao amin'ny Holafitra Nasionalin'ny Dokotera Veterinera Malagasy sy ireo mpampianatra ahy, mianiana 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 ny rariny sy ny hitsiny;
- b. Tsy hivadi-belirano amin'ny lalàn'ny voninahitra, ny fahamendrehana, ny fanajana ny rariny sy ny fitsipi-pitondran-tena eo am-panatanterahana ny asa maha Dokotera Veterinera.;
- c. Hanaja ireo nampianatra ahy, ny fitsipiky ny hai-kanto. Hampiseho ny sitraka sy 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 ho ahy 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'ny olombelona sy ny biby;
- g. Hiezaka hahafehy ireo fahalalana vaovao sy hai-tao momba ny fitsaboana biby ary hampita izany amin'ny hafa ao anatin'ny fitandroana ny fifanakalozana amin'ny hairaha mifandray amin'izany mba hitondra fivoarana ho azy;
- h. 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 mahatanteraka ny velirano nataoko.

Ho rakotry ny henatra sy horabirabian'ireo mpiray asa amiko kosa aho raha mivadika amin'izany. »

PERMIS D'IMPRIMER

LU ET APROUVE

Le Directeur de Thèse,

Signé : Professeur RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO Henriette

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Doyen de la Faculté de Médecine d'Antananarivo

Signé: Professeur SAMISON Luc Hervé

First name and name: RAMAROSOA Ny Aina Fandresena

Title of thesis: “CHARACTERIZATION OF *Vibrios*, *Aeromonas* AND *Pseudomonas* ON FRESHWATER FISH”

Heading: Fundamental Sciences

Number of pages: 96 Number of tables: 30

Number of figures: 20 Number of annexes: 05

Number of bibliographical references: 60

ABSTRACT

Introduction: The fish consumption worldwide has increased steadily over the past decade, yet the health inspection of these products has always been and remains to date a minority for most states including Madagascar.

Materials and methods: 59 samples of the most traded freshwater fishes were collected in the markets of the city of Antananarivo including any category including fish farming. Those samples have passed bacteriological analysis whose confirmation is performed MALDI TOF and PCR then, were tested with antibiotic susceptibility.

Results: 32.2% of samples were contaminated by *Vibrio* spp. with 47% were *V.cholerae*; 54.2% in *Aeromonas*, 42.4% in *Salmonella* spp. All the germs counted have a number higher than the norm and with another bacterium found; only *P.aruginosa* and *Enterococcus casseliflavus* haven't shown antibiotic resistance.

Conclusion: Freshwater fishes offered for sale in the city of Antananarivo are contaminated with potentially pathogenic bacteria, but their source remains to be studied later.

Keywords: freshwater fishes, bacteria, MALDI TOF, PCR, antibiotic resistance,

Director of thesis: Professor RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO
Henriette

Reporter of thesis: Doctor RAZANAJATOVO Iony Manitra

Author's address: Lot IVC 35 Ambatomitsangana

Nom et Prénoms : RAMAROSOA Ny Aina Fandresena

Titre de la Thèse : « CARACTERISATION DES *Vibrios* , *Aeromonas* ET
Pseudomonas SUR POISSONS D'EAUX DOUCES »

Rubrique : Sciences Fondamentales

Nombre de pages : 96

Nombre de Tableaux : 30

Nombres de figures : 20

Nombre d'annexes : 05

Nombre de bibliographies : 60

RÉSUMÉ

Introduction : La consommation en poissons au niveau mondial n'a cessé d'augmenter durant la dernière décennie, pourtant, l'inspection sanitaire de ces produits a toujours été et reste jusqu'à présent une minorité pour la plupart des Etats y compris Madagascar.

Méthode : 59 échantillons de poissons d'eaux douces les plus commercialisés ont été prélevés dans les marchés de la ville d'Antananarivo incluant toute catégorie y compris les poissons d'élevage et ont subi une bactériologie dont la confirmation s'est effectuée au MALDI TOF et au PCR et la recherche de pathogénicité via un antibiogramme.

Résultats : 32,2% des échantillons sont contaminés en *Vibrio* spp. dont 47% du *V. cholerae* ; 54,2% en *Aeromonas*, 42,4% en *Salmonella* spp. Les germes dénombrés présentent tous un nombre supérieur à la norme et avec les autres bactéries rencontrées, seules *P.aruginosa* et *Enterococcus casseliflavus* n'ont pas montré d'antibiorésistance.

Conclusion : Les poissons d'eaux douces présentés en vente dans la ville d'Antananarivo sont très contaminés en des germes potentiellement pathogènes, toutefois leur source reste encore à étudier ultérieurement.

Mots clés : poissons d'eaux douces, bactéries, MALDI TOF, PCR, antibiorésistance.

Directeur de thèse : Professeur RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO
Henriette

Rapporteur de thèse : Docteur RAZANAJATOVO Iony Manitra

Adresse et Contact de l'auteur : Lot IVC 35 Ambatomitsangana