

SOMMAIRE

Liste des figures	iv
Liste des tableaux	iv
Liste des abréviations.....	v
INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : CONTEXTE GENERAL	3
I – Généralités sur le germe.....	3
I – 1 – Descriptions et caractéristiques du germe	3
I – 1 – 1 – Position taxonomique du germe	3
I – 1 – 2 – Description du germe	3
I – 1 – 3 – Caractères biochimiques	4
I – 2 – Pouvoir pathogène du germe	4
I – 3 – Manifestation clinique	5
I – 4 – Habitat du germe.....	5
I – 5 – Mode de transmission du germe	6
I – 6 – Exemple à l'appui : <i>Campylobacter jejuni</i>	7
II – Eau de boisson à Madagascar	8
II – 1 – Importance de l'eau	8
II – 2 – Ressources en eau de la Grande Ile	8
II – 3 – Potabilité de l'eau	11
II – 4 – Accès à l'eau potable.....	11
II – 5 – Pollution de l'eau.....	12
II – 6 – Maladies associées à l'eau.....	12
PARTIE 2 : MATERIELS et METHODES	13
I – Prélèvements	13
I – 1 – Site d'étude et lieux de prélèvements	13
I – 2 – Stratégie d'échantillonnage.....	14
I – 3 – Transport des échantillons	14
I – 4 – Règles de prélèvement des échantillons d'eau.....	14
II – Méthode d'analyses microbiologiques	15

II – 1 – Recherche de <i>Campylobacter</i>	15
II – 1 – 1 – Principe	15
II – 1 – 2 – Isolement et Identification	16
II – 1 – 3 – Confirmation phénotypique	16
II – 1 – 4 – Confirmation biochimique	17
II – 1 – 5 – Confirmation de l'espèce	19
II – 1 – 6 – Conservation des souches	21
II – 2 – Analyses de la qualité de l'eau	22
II – 2 – 1 – Principe	22
II – 2 – 2 – Préparation des échantillons	23
II – 2 – 3 – Valeurs maximales admissibles	23
III – 1 – Généralités sur la méthode de PCR	24
III – 1 – 1 – Dénaturation	24
III – 1 – 2 – Hybridation des amorces	24
III – 1 – 3 – Elongation ou la polymérisation	24
III – 2 – Principe de la PCR multiplex	26
III – 3 – PCR conventionnelle	26
III – 4 – Extraction de l'ADN	27
III – 5 – Primers ou amorces	28
IV – Méthode d'analyses statistiques	29
IV – 1 – Test chi-deux d'indépendance	29
IV – 2 – Fréquence des échantillons positifs	29
IV – 3 – Régression linéaire	29
PARTIE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	30
I – Sites de prélèvements.....	30
II – Analyses microbiologiques	31
II – 1 – Recherche de <i>Campylobacter</i>	31
II – 2 – Analyse de la qualité de l'eau	34
II – 2 – 1 –Dénombrement des colonies.....	34
II – 2 – 2 – Aspect des colonies	35
III – Analyse moléculaire.....	35

IV – Analyses statistiques	36
IV – 1 – Dépendance entre la présence du germe et les catégories d'eau.....	36
IV – 2 – Fréquence d'isolement du germe	37
IV – 3 – Analyse de la corrélation entre la présence de <i>Campylobacter</i> et la charge microbienne.....	37
PARTIE 4 : DISCUSSION.....	30
I – Fréquence d'isolement du germe	39
II – <i>Campylobacter</i> dans l'eau	39
III – Contamination de l'eau	40
IV – Qualité de l'eau en termes de charge microbienne	41
V – Analyse moléculaire	42
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	43
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	44
GLOSSAIRE	
ANNEXE I : DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES REVIVIFIABLES à 36° C et à 22° C POUR DES DILUTIONS au 100 ^{ème}	I
ANNEXE II : MILIEUX DE CULTURES	V
ANNEXE III : FICHE D'IDENTIFICATION DES GERMES « <i>Campylobacter</i> » THERMOTOLERANTS.....	VII
ANNEXE IV : RESUME DU PROJET MADES.....	IX
ANNEXE V : PHOTOS DE QUELQUES MATERIELS UTILISES AU LABORATOIRE.....	XI

Liste des figures

Figure 1 : Interactions écologiques de <i>Campylobacter</i> : l'environnement, l'eau, les aliments et les infections à <i>Campylobacter</i>	6
Figure 2 : Image au microscope à balayage électronique de bactéries <i>Campylobacter jejuni</i>	8
Figure 3 : A, Carte des précipitations annuelles ; B, Carte montrant les principaux cours d'eau de la Grande Ile.....	10
Figure 4 : Carte des différents sites de prélèvements.....	13
Figure 5 : A : Préenrichissement au bouillon Preston ; B : Isolement sur CCDA	16
Figure 6 : Oxydase positif	17
Figure 7 : Catalase positif	17
Figure 8 : Hydrolyse de l'hippurate de sodium.....	20
Figure 9 : Schéma récapitulatif de la recherche de <i>Campylobacter</i>	21
Figure 10 : Schéma récapitulatif du dénombrement des FTMA.....	23
Figure 11 : Schéma de la réaction de PCR sur plusieurs cycles (Vierstarcke, A., 1999)	25
Figure 12 : Plateaux de température des cycles de PCR (Mornet, E., 2011)	25
Figure 13 : Gel d'électrophorèse avec les différentes tailles en paires de bases des amplicons (Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007).....	28
Figure 14 : Répartition en nombre de chaque catégorie d'eau.....	31
Figure 15 : Isolement de <i>Campylobacter</i> sur CCDA.	32
Figure 16 : <i>Campylobacter</i> vu au microscope optique à fort grossissement 10 x 100	32
Figure 17 : AntibioGramme à l'acide nalidixique et à la céphalotine	33
Figure 18 : Nombre de colonies x 10 ² se développant à 36° C pour chaque échantillon	34
Figure 19 : Nombre de colonies x 10 ² se développant à 22° C pour chaque échantillon	35
Figure 20 : Gel d'électrophorèse (Rajaofara, Hery., 2011).....	36
Figure 21 : Corrélation entre la présence de <i>Campylobacter</i> et la charge microbienne	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Interprétation des résultats de gélose TSI	18
Tableau 2 : Tests de confirmation du genre <i>Campylobacter</i> pour les espèces thermotolérantes	18
Tableau 3 : Caractéristiques de <i>Campylobacter</i> thermotolérant	20
Tableau 4 : Valeurs maximales admissibles de FTMA	23

Tableau 5 : Conditionnement du thermocycleur Biometra 3 000	26
Tableau 6 : Différentes concentrations du mix réactionnel.....	27
Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR Multiplex et les tailles en paire de bases (pb) des produits PCR	28
Tableau 8 : Lieux de prélèvement des eaux de boisson.....	30
Tableau 9 : Récapitulatif des résultats positifs.....	33
Tableau 10 : Nombre de présence et/ou d'absence du germe selon les catégories d'eau	36
Tableau 11 : Tableau récapitulatif et fréquence des échantillons positifs	37

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de NORmalisation

° C : degré Celsius

BET : Bromure d'éthidium

FTMA : Flore Totale Mésophile Aérobie

Gélose CCDA : Gélose à la cefopérazone, au charbon et au désoxycholate

Gélose MH ou MHB (Mueller Hinton Blood) : Gélose Mueller Hinton à 5% de sang de mouton

ISO : International Organization for Standardization

Gélose TSI : Gélose au citrate de fer et au trois sucres

LHAE : Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement

LES : Laboratoire d'Epidémio-Surveillance

ml : millilitre

µl : microlitre

EN : European Norme

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

UFC : Unité Formant des Colonies

VBNC : Viable But Non Culturable

ONU : Organisation des Nations Unies

INTRODUCTION

Dans les pays développés, le germe *Campylobacter* est reconnu comme l'une des causes habituelles de gastro-entérite humaine depuis son identification par Skirrow en 1977 (Skirrow, 1977). Il est l'un des premiers pathogènes responsable des infections entériques d'origine zoonotique (WHO, 2001). Les réservoirs de ces bactéries sont les volailles et d'autres animaux d'élevages, qui occasionnent la contamination de plusieurs catégories de denrées alimentaires. Le contact direct avec les animaux et l'ingestion des aliments souillés sont considérés comme les principales voies de transmission de l'infection à l'homme (Georges-Courbot *et al.*, 1990; WHO, 2001; Coker *et al.*, 2002). Cependant, d'autres voies de contamination existent et ne doivent pas être négligées. D'une manière générale, l'eau de consommation souillée est considérée également comme l'une des sources de campylobactérioses, d'après l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (Colin, 2006).

L'existence de *Campylobacter* spp. dans les milieux aquatiques fut l'objet d'études dans de nombreux cas. En Angleterre, un réseau fluvial traversant les zones rurales et urbaines fut contaminé par ce germe (Bolton *et al.*, 1987 ; Jones *et al.*, 1999). En Nouvelle Zélande, la présence de la bactérie a été révélée dans les eaux de rivières (Savill *et al.*, 2001 ; Eyles *et al.*, 2003 ; Devane *et al.*, 2005). Et aux Etats-Unis, les eaux de montagnes et de rivières ont été échantillonnées pour déterminer la distribution et l'écologie du germe *Campylobacter* (Carter *et al.*, 1987 ; Vereen *et al.*, 2007). Pour le cas de Madagascar, aucune étude antérieure n'a été faite sur la recherche de cette bactérie dans les eaux. Il a été mentionné également que la potabilité de l'eau dans la Grande Ile est insuffisante dans les zones rurales (Vicens & Coulanges, 1982).

Les études relatives à l'eau et aux maladies gastro-intestinales visent généralement à déterminer une causalité des cas épidémiologiques ; une étude menée en Espagne a montré que les eaux de puits étaient épidémiologiquement associées à la présence de *Campylobacter coli* (David Pérez-Boto *et al.*, 2010). Les perspectives actuelles visent à étudier la survie et l'épidémiologie de *Campylobacter* spp. dans les systèmes d'eau naturelle (Thomas *et al.*, 1998). A Madagascar, un pays en voie de développement, les diarrhées sont considérées comme la troisième cause de morbidité dans les centres de santé (Calvertone et Maryland, 2005). A Antananarivo, une étude étiologique de diarrhées infantiles ont permis de déterminer la prévalence et le rôle de nombreux agents pathogène à savoir le germe *Campylobacter* (Cassel-Beraud *et al.*, 1992).

Les études préliminaires entreprises par l'Unité Epidémiologie de l'Institut Pasteur de Madagascar ont permis de faire ressortir une prévalence élevée notée dans la

zone rurale de Moramanga. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une évaluation des impacts environnementaux sur les diarrhées infantiles causées par *Campylobacter* dans cette région. La prévalence élevée mène à supposer une circulation du germe *Campylobacter* dans le milieu. L'eau de boisson a été choisie comme unité à analyser en tant que facteur environnemental. La qualité de l'eau consommée est souvent mise en question lors des manifestations diarrhéiques, d'autant plus que dans les pays pauvres, les agences de surveillance sanitaire n'existent guère. La présence de l'épidémie causée par la Campylobactériose dans la région de Moramanga est-elle d'origine hydrique ?

L'objectif de la présente étude est de vérifier si l'eau consommée par les villageois de Moramanga est un vecteur de propagation du pathogène : *Campylobacter*. Les objectifs spécifiques visent :

- à dresser un profil de contamination des eaux de boisson par le germe *Campylobacter* ;
- à donner un aperçu de la qualité de l'eau en terme de charge microbienne, en vue de prendre d'éventuelles dispositions.

Au cours de cette recherche, une autre méthode d'analyse PCR est mise en place pour la recherche du germe, mais elle nécessite une validation par rapport à la méthode de référence qui est l'analyse microbiologique.

Pour atteindre ces objectifs, des analyses qualitatives microbiologiques et moléculaires des eaux de boisson sont effectuées, permettant la mise en évidence de la présence du germe *Campylobacter* dans l'environnement. L'évaluation de la charge microbienne est faite pour discerner la conformité de l'eau.

Dans le présent document, la première partie sera consacrée à quelques généralités ; suivie de la deuxième partie, expliquant les matériels utilisés et méthodes appliquées entreprises lors de cette étude. La troisième partie met en évidence les résultats obtenus avec leurs interprétations. En dernier lieu, la quatrième partie est consacrée à la discussion.

PARTIE 1 : CONTEXTE GENERAL

I – Généralités sur le germe

Les généralités traitent les aspects descriptifs, systématiques, écologiques et épidémiologiques de la bactérie *Campylobacter*.

I – 1 – Description et caractéristiques

I – 1 – 1 – Position taxonomique du germe

Règne :	Bacteria
Embranchement :	Proteobacteria
Classe :	ϵ -Proteobacteria
Ordre :	Campylobacterales
Famille :	Campylobacteraceae
Genre :	<i>Campylobacter</i>

La classification a été prélevée dans la 2nde édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrrity *et al.*, 2004). L'embranchement des Protéobactéria est le groupe le plus important et le plus diversifié du règne Bacteria (Prescott *et al.*, 1999). Ce règne fut défini par une différence fondamentale de ces microorganismes, en étant des cellules procaryotes (Batzing, 2002). Les ϵ -Proteobacteria sont caractérisés par des bacilles à Gram négatif pouvant être incurvés ou hélicoïdales. Cet embranchement est déterminé par la présence d'une protéine spécifique ribosomiale propre aux ϵ -Proteobacteria (Gupta, 2006). Ce groupe comprend un seul ordre, Campylobacterales. Ce dernier est formé par deux familles : Campylobacteraceae et Helicobacteraceae, dont les caractéristiques sont une croissance en microaérophilie et une mobilité distinctive (Batzing, 2002). Le germe *Campylobacter* avec les genres *Acrobacter* et *Sulfurospirillum* forment la famille des *Campylobacteraceae* (Vandamme *et al.*, 1991). Certains *Campylobacter* sont dits thermotolérants dont la température requise pour leur croissance est comprise entre 30°C et 48°C ; avec une température de croissance optimale égale à 42°C (Vandamme *et al.*, 1991). Ce groupe comprend les espèces *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter upsaliensis* et *Campylobacter lari*

I – 1 – 2 – Description du germe

Campylobacter est une bactérie, ayant entre 0.2 μ m et 0.8 μ m de large et 0.5 μ m à 5 μ m de long, à coloration Gram négative dont la morphologie est spiralée ou incurvée ; leur mobilité en vol de moucheron est caractéristique grâce à un flagelle situé à chaque extrémité des pôles (Prescott *et al.*, 1999). Un taux de 2 à 10 % d'oxygène, 5 à 10 % de

dioxyde de carbone, (et si possible 5 à 9 % d'hydrogène) est nécessaire pour sa croissance optimale, ainsi qu'une température comprise entre 37°C et 42° C (Vandamme *et al.*, 1991), d'où l'appellation de *Campylobacter* thermotolérant.

I – 1 – 3 – Caractères biochimiques

Le germe *Campylobacter* est une bactérie à oxydase positive, une des particularités des bacilles à Gram négatif. La réaction d'oxydase met en évidence la capacité de la bactérie à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée produisant une couleur violacée (figure 6). La recherche de cette oxydase consiste à déceler la présence d'un enzyme de la chaîne respiratoire qui est le cytochrome-oxydase (Prescott *et al.*, 1999).

C'est également une bactérie qui possède une enzyme, la catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et de l'eau ($H_2O + \frac{1}{2} O_2$) (Prescott *et al.*, 1999). Elle réagit au contact de l'eau oxygénée en produisant des bulles d'oxygènes (figure 7).

Ce germe ne fermente ni n'oxyde les hydrates de carbones (CH_2O), leur physiologie ne nécessite pas l'assimilation du sucre et ne le métabolise pas (Prescott *et al.*, 1999).

I – 2 – Pouvoir pathogène du germe

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont des microorganismes connus comme agents responsables de diarrhées. Les espèces *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont actuellement reconnues comme une des principales causes d'entérite aiguë (Skirrow, 1977). L'infection se manifeste chez 68% des enfants lors d'une étude de la place des *Campylobacter* dans les diarrhées infectieuses de l'enfant (Labenne *et al.*, 1991). Ce germe fut décrit réellement comme pathogène alimentaire dans les années 77 (Skirrow, 1977). La plupart des espèces de *Campylobacter* sont assez peu pathogènes pour les animaux qui les hébergent généralement de manière asymptomatique. Mais ils peuvent toutefois être responsables d'avortements chez les ruminants et de troubles digestifs chez le porc, les oiseaux et même les carnivores domestiques. A l'origine d'infection diarrhéique chez les humains, cette bactérie figure parmi les premiers pathogènes responsables de maladies gastro-intestinales dans le monde (Tauxe, 1992). Sa virulence est redoutée et fait l'objet de surveillance sanitaire dans les pays développés.

I – 3 – Manifestation clinique

La maladie humaine la plus fréquemment observée est une entérite aiguë, causée par une infection intestinale, pouvant se compliquer par une bactériémie. La présentation clinique diffère selon l'espèce. *C. fetus* est l'espèce majoritaire en France (Pacanowski *et al.*, 2010). En comparaison avec les patients présentant une bactériémie à *C. jejuni* ou à *C. coli*, ceux avec une bactériémie à *C. fetus* sont plus souvent des hommes, âgés (Pacanowski *et al.*, 2010). La durée d'incubation est comprise entre 2 et 10 jours (Prescott *et al.*, 1999). L'infection entérique se manifeste particulièrement par des diarrhées (90 % des cas), des douleurs abdominales, des selles sanguinolentes, de la fièvre et parfois des nausées et des vomissements (Colin, 2006). La plupart des toxi-infections alimentaires collectives liées à *Campylobacter* spp. sont associées à la consommation d'eau, d'aliments ou de lait cru contaminés. Chez les enfants, un syndrome de Guillain-Barré est souvent observé ; cette pathologie est une inflammation de plusieurs nerfs qui survient subitement et de façon transitoire due à un mécanisme d'agression de ces nerfs par les anticorps propres à l'organisme.

I – 4 – Habitat du germe

Le germe *Campylobacter* a pour hôte réservoir les animaux à sang chaud tels que les volailles et les animaux d'élevages (Prescott *et al.*, 1999). Il semble que leur niche écologique soit constituée par le tube digestif de ces animaux. Ces bactéries réussissent à coloniser la muqueuse intestinale d'un large éventail d'hôtes, aviaires et mammaliens, y compris les humains et éventuellement des appareils reproducteurs chez les bovins pour certaines espèces de *Campylobacter fetus* responsable d'avortements. En général, cette colonisation est, soit un commensalisme comme dans les oiseaux, soit à l'origine d'un syndrome infectieux chez les humains. Bien que *Campylobacter* ne croisse pas en dehors de l'hôte, il peut rester viable pendant quelques périodes dans l'eau, dans les aliments ; dans ces conditions, ces microorganismes s'adaptent à de nombreuses contraintes environnementales. Une étude menée en Nouvelle Zélande a montré que les écosystèmes d'eau douce, avoisinant les fermes d'élevage, font l'objet d'une contamination à *Campylobacter* thermotolérants (Eyles *et al.*, 2003).

La présence de *Campylobacter* dans l'environnement, notamment dans les eaux, varie selon plusieurs facteurs : les effluents, le flux des eaux usées et les déjections des animaux porteurs du germe. La densité de ces germes varie selon les sources de contamination. Des études sur les flux dans le Nord-ouest de l'Angleterre ont montré que

les bactéries *Campylobacter* sont absentes dans des ruisseaux qui traversent les hautes terres, mais sont présentes dans les mêmes cours d'eau passant par les pâturages des bovins (Jones *et al.*, 1990 ; Jones and Hobbs, 1996). La présence de *Campylobacter* dans l'environnement peut être considérée comme une contamination fécale récente, vu que cette bactérie ne se multiplie que dans son hôte réservoir (Jones, 2001). Ce pathogène a été isolé dans un large éventail d'échantillons environnementaux : les fientes des animaux d'élevage, le sol et l'eau (Brown *et al.*, 2004).

I – 5 – Mode de transmission du germe

Le pathogène peut se transmettre par voie direct : le contact avec les animaux porteurs du germe ; ou indirectes : par le biais de l'alimentation ou l'exposition à un environnement contaminé (Prescott *et al.*, 1999). L'évaluation des risques pour l'homme d'attraper le germe est montrée sur la figure 1, mettant en évidence les interactions entre les hôtes réservoirs du germe, l'homme et son environnement. Les humains sont exposés au germe *Campylobacter* par une gamme de facteurs d'origine alimentaire et environnementale.

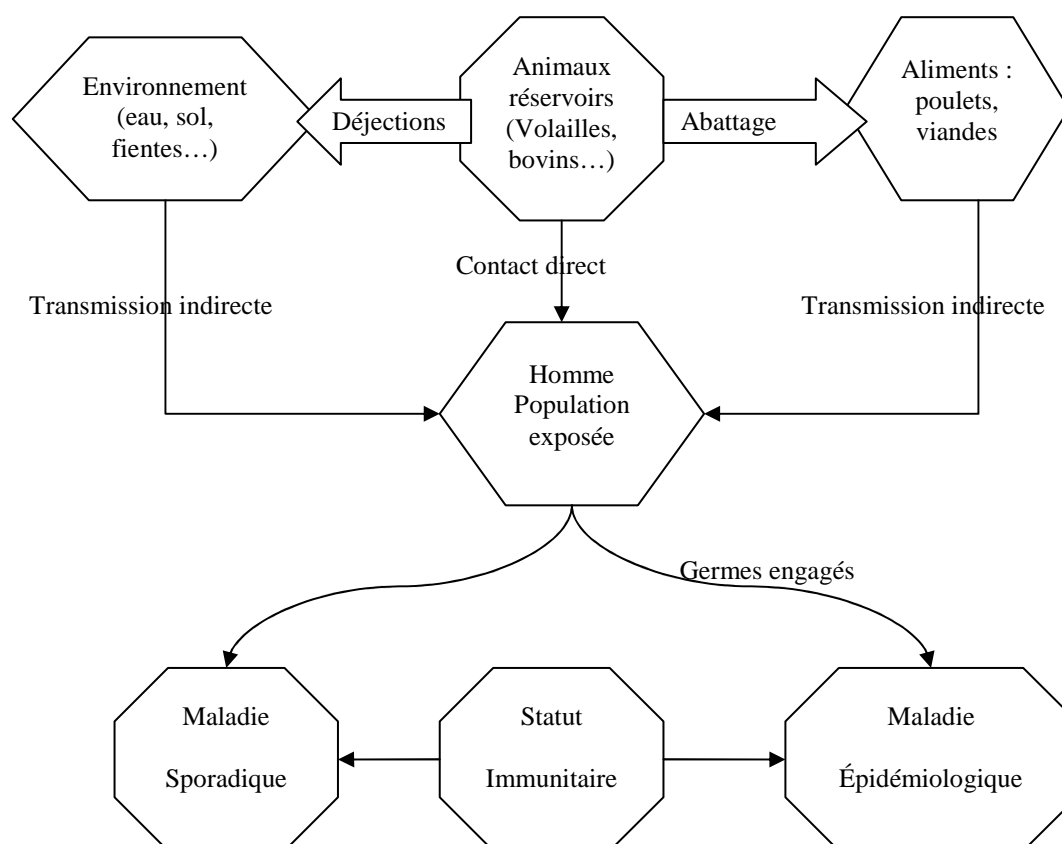


Figure 1: Interactions écologiques de *Campylobacter* : l'environnement, l'eau, les aliments et les infections à *Campylobacter* (Andrianavoravelona, D., 2011)

Les germes peuvent être diffusés à l'extérieur par l'intermédiaire des déjections et participent ainsi à la contamination de l'environnement (figure 1). L'eau peut être infectée par les effluents ou les excréments d'animaux. Plusieurs autres facteurs de risques liés aux aliments ont été déterminés plusieurs fois dont l'ingestion d'autres types de nourritures et de viande crue ou cuite au barbecue (Oosterom *et al.*, 1984; Ikram *et al.*, 1994), de crustacés et de coquillages, d'eau de surface non traitée (Hopkins *et al.*, 1984). Plusieurs sources peuvent être considérées comme à l'origine de la propagation du germe. Le non respect de l'hygiène contribue en grande partie à cette circulation qui va de l'homme à son entourage. Le rejet des effluents sans aucune infrastructure de traitement (les évacuations, les canalisations) est à l'origine des pollutions organiques. Bien que la survie de cette bactérie dans l'environnement hydrique soit relativement faible, les eaux de rivières, des étangs, des lacs peuvent être un réservoir non négligeable. Les eaux de surfaces sont impliquées aussi dans la transmission de *Campylobacter* et peuvent être d'importants réservoirs (Denis *et al.*, 2009).

I – 6 – Exemple à l'appui : *Campylobacter jejuni* (Prescott *et al.*, 1999)

Campylobacter jejuni est une bactérie Gram négatif, bacille incurvée munie d'un flagelle à l'extrémité de chaque pôle (figure 2), lui donnant sa mobilité. Elle se multiplie dans une atmosphère microaérobie (5 à 10 % d'oxygène et 3 à 10 % de dioxyde de carbone). Cette bactérie colonise le tractus intestinal des animaux. Des études sur les poulets, les dindes et les bétails ont démontré que jusqu'à 50 à 100% de ces volailles ou troupeaux excrètent le germe *C.jejuni*. Cette bactérie a été également isolée d'un grand nombre d'échantillon provenant des eaux de surface. Elle se transmet à l'homme par la consommation d'aliment ou d'eau souillé ou par le contact direct avec les animaux réservoirs. *C.jejuni* cause environ 2 million de cas de gastro-intestinales ou campylobacteriose aux Etats Unis tous les ans. La période d'incubation dure 2 à 10 jours, ce germe envahit l'épithélium intestinal et cause des inflammations par la production d'une exotoxine. Les symptômes incluent la diarrhée, la fièvre, de sévères inflammations accompagnées d'ulcère et de selles sanguinolentes.

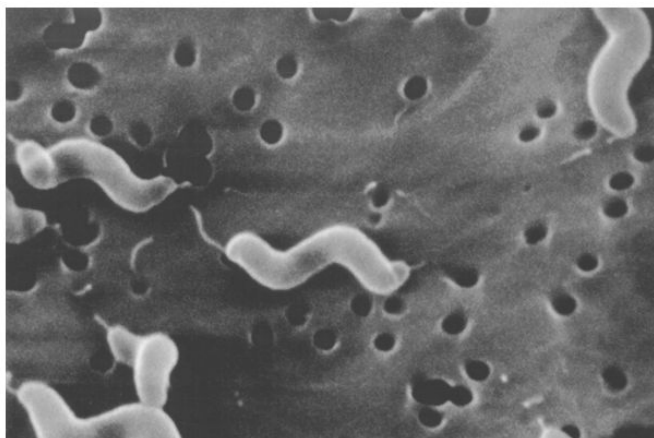


Figure 2 : Image au microscope à balayage électronique de bactéries *Campylobacter jejuni*
Source: Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, Virginia

II – Eau de boisson à Madagascar

II – 1 – Importance de l’eau

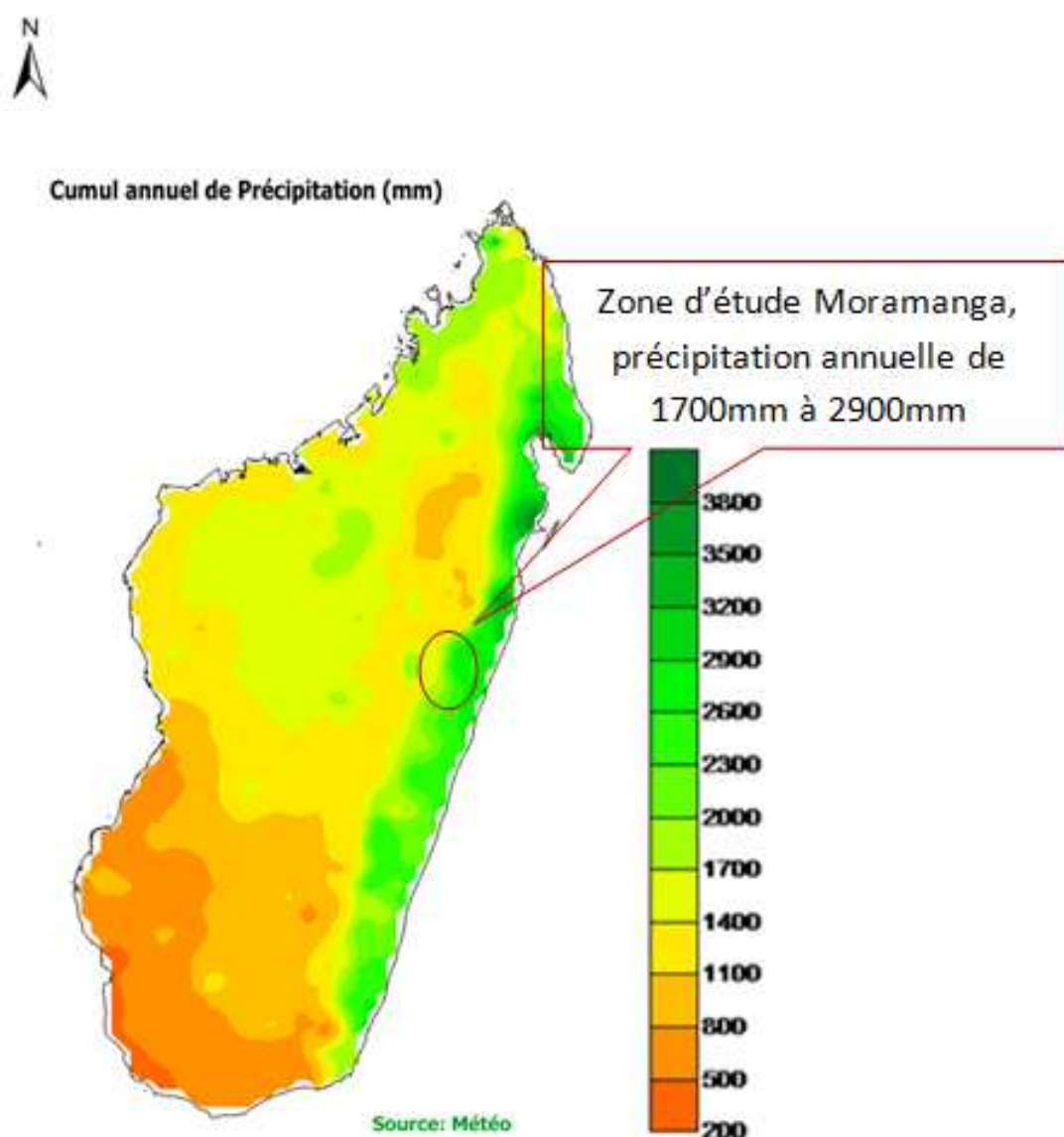
L’eau est indispensable, elle joue un rôle déterminant dans la vie des hommes, des animaux et des plantes. Dans la vie quotidienne, elle est une ressource faite pour de nombreux usages : l’agriculture, l’élevage, les usages domestiques. Elle joue également un rôle très important dans les systèmes écologiques. Par ailleurs, l’eau peut aussi engendrer des effets néfastes à cette vie. Elle peut transmettre des maladies dans les pays de tous les continents, des plus pauvres aux plus riches. Parfois, des maladies épidémiques ont pour origine la consommation d’eau non potable (Monjour, 1997), pouvant parfois induire une mortalité plus ou moins élevée. Les infections intestinales et les diarrhées d’origine hydrique et/ou alimentaire sont les principales maladies qui provoquent des épidémies, surtout dans les pays en voie de développement où la surveillance sanitaire est encore un effort à déployer. La plupart de maladies diarrhéiques sont reliées à la mauvaise qualité de l’eau, à un assainissement insuffisant et à une hygiène défectueuse.

II – 2 – Ressources en eau de la Grande Ile

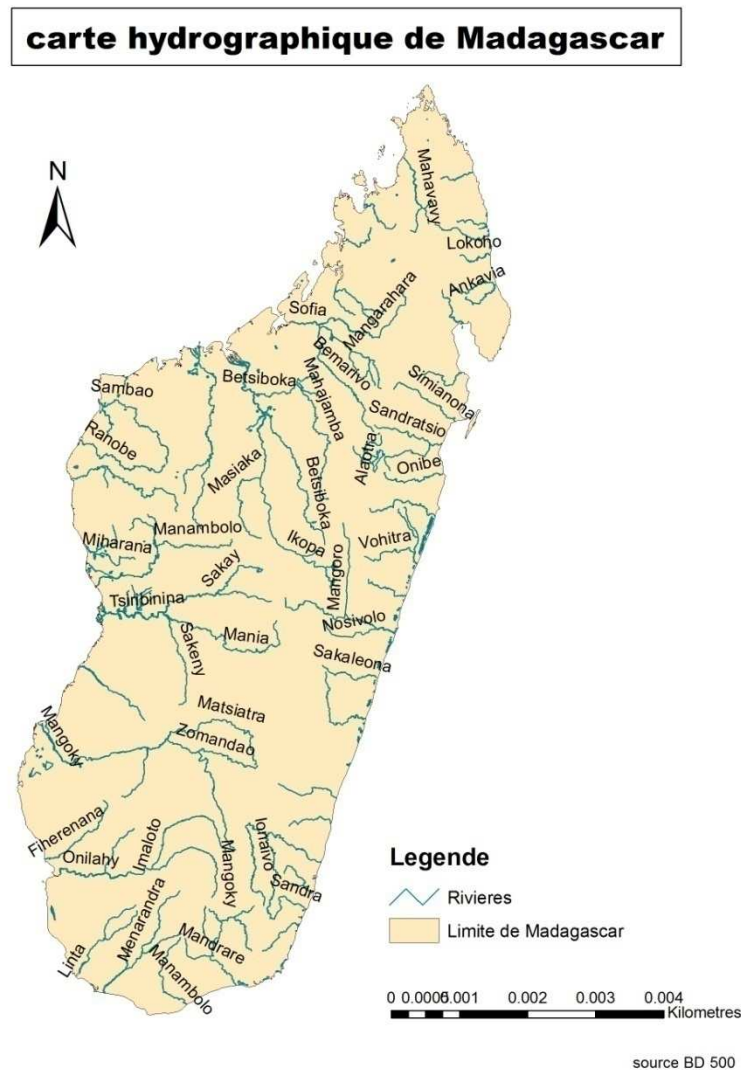
Elles sont constituées par les eaux continentales superficielles, les apports pluviométriques, et les eaux souterraines (Chaperon *et al.*, 1993). Les eaux continentales sont représentées par les rivières, les fleuves et les lacs qui constituent les écosystèmes aquatiques de surface. Les apports pluviométriques sont les précipitations et contribuent à

l'alimentation des eaux de surface ainsi que des eaux souterraines. Ces dernières proviennent de l'infiltration des eaux de surface et des eaux de pluie à travers les couches terrestres, formant une nappe phréatique à l'encontre d'une couche imperméable. Généralement les eaux des nappes souterraines sont potables et sont à l'origine des sources naturelles d'eau.

La précipitation annuelle en mm et les principaux cours d'eau de la Grande Ile sont représentés par la figure 3



A



B

Figure 3 : A, Carte des précipitations annuelles ; B, Carte montrant les principaux cours d'eau de la Grande Ile (Source : Direction de la Météorologie et la FTM)

Les principales sources en eau dans les zones rurales sont les rivières, les puits, les eaux de sources, les rizières et les lacs, qui sont destinées à des fins récréatives ainsi qu'à la boisson. Ces eaux dont la population rurale dispose, subissent rarement des traitements pour les rendre potables (Vicens & Coulanges, 1982). Généralement, les eaux destinées à la consommation sont éventuellement bouillies par précaution. En terme de santé publique, l'eau contaminée par des agents pathogènes est l'une des principales causes de maladies diarrhéiques, d'où l'importance de la surveillance de la qualité de l'eau consommée par la population (Colins, 2006).

II – 3 – Potabilité de l'eau

Une eau potable est définie comme une eau destinée à la consommation humaine qui, par traitement ou naturellement, répond à des normes organoleptiques, physico-chimiques, microbiologiques. L'aspect, l'odeur et le goût définissent les qualités organoleptiques. Pour la qualité physico-chimique, l'eau ne doit pas contenir des produits chimiques indésirables (fer, manganèse) ou toxiques (mercure, plomb) qui seraient nocifs à la santé de l'homme, à court ou à long terme (OMS, 1998). La qualité microbiologique est appréciée par sa charge en microorganismes, l'eau potable ne doit contenir aucun germe pathogène (bactéries, virus, parasites...) qui provoquerait des maladies chez le consommateur. La qualité bactériologique est la plus importante sur la potabilité de l'eau, par rapport à la qualité physico-chimique et organoleptique.

La nature et la forme des normes s'appliquant à l'eau de boisson peuvent varier d'un pays ou d'une région à l'autre. Il n'existe pas d'approche unique, universellement applicable. Lors du développement et de la mise en œuvre des normes, il est essentiel de prendre en compte la législation, la santé, l'administration locale et d'évaluer la capacité du pays à établir des réglementations et à les faire appliquer. Des démarches susceptibles de fonctionner dans un pays ou une région ne sont pas nécessairement transposables à d'autres pays ou régions. Il importe que chaque pays fasse le bilan de ses besoins et de ses capacités pour la mise au point d'un cadre réglementaire.

II – 4 – Accès à l'eau potable

L'accès à l'eau potable à Madagascar est problématique. Généralement dans les zones rurales, les eaux de boisson ne font l'objet d'aucune surveillance sanitaire. Il est estimé qu'en 1999, moins d'un cinquième de la population nationale a accès à l'eau potable propre – acheminée à domicile ou à partir de bornes fontaines publiques (Calverton & Maryland, 2005). Pourtant le gouvernement malgache a mis en place le code de l'eau (loi n° 98 029, janvier 1999) qui stipule une amélioration de l'accès de l'eau potable par le peuple. Un accès à l'eau potable nécessite un grand effort pour Madagascar surtout dans les zones enclavées. Il y va de soi que la qualité de l'eau dans les zones rurales ne suit pas les normes imposées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la potabilité de l'eau.

Faute de moyens, la majorité des gens issus d'un pays pauvre comme Madagascar ne peut s'offrir un contrôle sanitaire de l'eau destinée à la consommation. Un contrôle qui peut coûter cher et seule une minorité de la population malgache peut s'en procurer.

II – 5 – Pollution de l'eau

La pollution de l'eau est une altération qui rend son utilisation dangereuse aussi bien pour la santé que pour l'environnement. Elle peut concerner les eaux superficielles (rivières, lacs, fleuves) et/ou les eaux souterraines. Elle peut se présenter sous différentes formes : pollution chimique, bactériologique, pathogène ou non. Elle constitue un outil pour refléter le niveau de la contamination des environnements. Elle peut provenir des effluents d'élevages, des déchets domestiques ainsi qu'industriels. Les rejets d'eaux domestiques, dites « eaux usées » ont depuis toujours altéré la qualité des cours d'eau, par l'entraînement de matières organiques susceptibles d'engendrer des contaminations bactériennes.

II – 6 – Maladies associées à l'eau

La qualité de l'eau de boisson suscite des inquiétudes pour la santé humaine dans tous les pays du monde. Les risques pour la santé sont liés à la présence d'agents infectieux, pathogènes, et/ou de produits chimiques toxiques. L'eau, l'hygiène et l'assainissement ont d'importantes répercussions sur la santé de la population. Parmi les maladies liées à l'eau, on retrouve les maladies provoquées par la présence de microorganismes pathogènes dans l'eau de boisson (Hartemann, 2001). Il a été rapporté par l'OMS que près de trois millions de personnes meurent chaque année, principalement des enfants, suite à des maladies causées par des eaux insalubres (OMS, 2001). Effectivement, ceux qui sont les plus exposés au risque de maladie véhiculée par l'eau sont les nourrissons et les jeunes enfants, les personnes affaiblies ou vivant dans de mauvaises conditions d'hygiène et les personnes âgées, ainsi que les immunodéprimés.

PARTIE 2 : MATERIELS et METHODES

I – Prélèvements

Les zones d'étude, les critères d'inclusion, les prélèvements d'eaux et la stratégie d'échantillonnage ont été définis et effectués par l'équipe de l'Unité Epidémiologie de l'Institut Pasteur de Madagascar, dans le cadre des travaux de recherches sur l'exposition environnementale des populations infantiles, à l'infection à *Campylobacter*.

I – 1 – Site d'étude et lieux de prélèvements

A Moramanga s'est implanté un site de recherche de l'Institut Pasteur de Madagascar, dans le cadre d'un projet d'étude sur des manifestations diarrhéiques infantiles. Les points de prélèvements ont été choisis pour être représentatifs des zones où la population est susceptible d'être exposée : celles où des cas d'infection à *Campylobacter* ont été détectés. Dans ce site de recherche, l'Institut Pasteur de Madagascar effectue plusieurs études et suivis épidémiologiques sur des cohortes. La présente étude a été effectuée dans le district de Moramanga, commune d'Ambohibary dont les délimitations sont : 18° 49' S et 18° 53' S pour la latitude et 48° 11' E et 48° 14' E pour la longitude. Pour la période de collecte, il a été décidé de décrire en premier lieu le niveau de contamination des eaux à partir du mois d'août jusqu'au mois de novembre 2011, sur un total de 10 hameaux. La localisation de ces différents hameaux est montrée sur la figure 4.

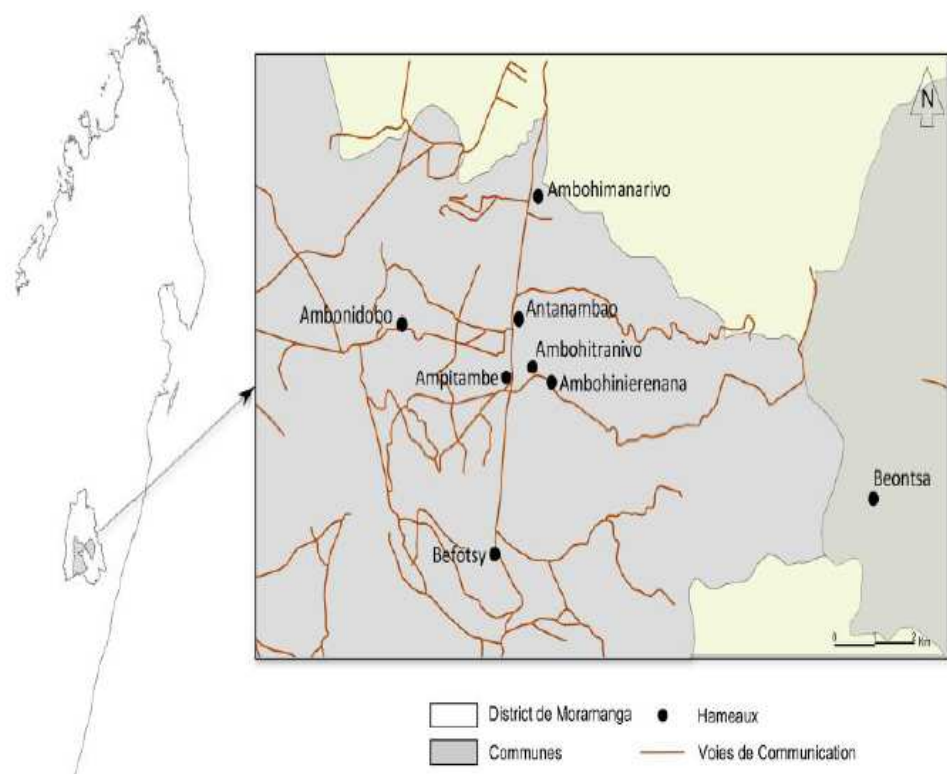


Figure 4 : Carte des différents sites de prélèvements (Randremanana, R., 2012)

Dans ces différents hameaux se situent les villages où les diarrhées infantiles se sont manifestées. La localisation des différents points d'eau collectifs est définie par rapport aux usages des villageois.

I – 2 – Stratégie d'échantillonnage

Un échantillonnage stratifié a été adopté pour avoir une meilleure appréciation, en catégorisant chaque type de prélèvement. Afin d'assurer une représentativité suffisante, les points d'eaux collectifs ont été prélevés à raison de 40 échantillons répartis dans les différents hameaux, le choix des points d'eaux étant exhaustif. Ces derniers regroupent des eaux de puits, de rivière, de rizière et de mare. En outre, des exemplaires d'eaux provenant des ménages avec des enfants porteurs symptomatiques, asymptomatiques et ceux n'ayant jamais été porteurs de *Campylobacter* spp. sont analysés. Les porteurs symptomatiques indiquent ceux qui excrètent le germe *Campylobacter* et présentent les symptômes de l'infection. Les porteurs asymptomatiques sont les individus porteurs de la bactérie chez lesquels la maladie ne se manifeste pas. Quant aux non porteurs désignent les êtres n'ayant jamais excrétés le germe.

I – 3 – Transport des échantillons

Le germe *Campylobacter* est particulièrement sensible aux conditions environnementales, en particulier la déshydratation, l'oxygène atmosphérique, la lumière du soleil et les températures élevées. Le transport au laboratoire et les étapes suivantes doivent donc être aussi rapides que possible (de préférence le jour même). Les prélèvements doivent être transportés dans une glacière accompagnés de plusieurs accumulateurs de froid ou des plaques eutectiques (cf annexe V), pour maintenir la température adéquate de $5 \pm 2^{\circ} \text{C}$, sinon les germes *Campylobacter* risquent de mourir rapidement. Un milieu de transport approprié augmente la probabilité de maintenir les bactéries *Campylobacter* présentes dans les échantillons en un état cultivable. Les échantillons doivent être protégés de la lumière.

I – 4 – Règles de prélèvement des échantillons d'eau

Les échantillons d'eau sont prélevés dans des flacons stériles fournis par l'Institut Pasteur de Madagascar, en vue d'une analyse microbiologique indiquée dans les normes appliquées au sein du Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement (LHAE). La qualité de l'analyse microbiologique dépend du respect des conditions

d'asepsie lors du prélèvement, dont le principe est décrit dans le mode opératoire du document qualité du LHAÉ.

II – Méthode d'analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont été effectuées au Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement (LHAÉ) de l'Institut Pasteur de Madagascar. La recherche par l'identification phénotypique et biochimique a été réalisée dans cette étude.

II – 1 – Recherche de *Campylobacter*

A l'arrivée au laboratoire, les échantillons d'eaux ont été analysés directement selon la norme A.F.N.O.R. (Association Française de Normalisation) en vigueur (ISO 10272) avec des modifications apportées suivant la méthode de filtration adoptée par Tai-lee Hu et Pao-chi Kuo en 2009.

La recherche de *Campylobacter* thermotolérant est la détermination de la présence ou de l'absence de ces micro-organismes dans une quantité déterminée d'eau, lorsque l'essai est effectué conformément au mode opératoire suivant :

II – 1 – 1 – Principe

Le principe de la recherche de *Campylobacter* thermotolérant comprend les étapes suivantes :

- Filtration de 1 L d'eau à travers une membrane filtrante stérile de 0,45 µm de porosité, pour amasser les microorganismes présent dans l'échantillon.
- Enrichissement en bouillon Preston et incubation en atmosphère micro-aérophile à 42°C pendant 48 h, pour multiplier les chances d'isoler le germe cible.
- Isolement de la culture obtenue en bouillon sur gélose sélectif à la cefopérazone, au charbon et au désoxycholate CCDA (figure 5 B) et incubation pendant 3 jusqu'à 5 jours à 42°C, en atmosphère micro-aérophile.
- Repiquage des colonies présumées être de *Campylobacter* thermotolérant pour la confirmation biochimique.

L'enrichissement sélectif consiste à déposer le filtre de la prise d'essai dans un milieu de culture sélectif, que l'on incube à 42° C pendant 48h dans une atmosphère micro-aérophile, pour augmenter la quantité d'unité pouvant former des colonies. Le milieu de culture est le bouillon Preston (figure 5 A) auquel est rajouté du sang de mouton stérile

ainsi qu'un supplément contenant des antibiotiques pour éliminer les flores interférentes. Le mode d'utilisation est indiqué sur la notice du supplément Preston.



Figure 5 : A : Prénrichissement au bouillon Preston ; B : Isolement sur CCDA
(Andrianaivoravelona, D., 2011)

II – 1 – 2 – Isolement et Identification

L'isolement est réalisé à l'aide d'un enseigneur de 10 μ l, à partir du bouillon Preston du pré-enrichissement, sur gélose CCDA (figure 5 B). Les boîtes sont incubées à $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en atmosphère micro-aérophile. La lecture des boîtes se fait après 24 heures ou plus généralement après 48 heures et même 3 à 5 jours d'incubation en examinant les colonies sur les boîtes. Sur gélose CCDA, les colonies sont grises, plates avec tendance à l'étalement d'où une certaine difficulté à les prélever à l'enseigneur.

II – 1 – 3 – Confirmation phénotypique

Elle est réalisée sur un total de 5 colonies typiques et/ou suspectes sur l'ensemble des boîtes ensemencées, s'il y en a moins de 5, on retient toutes les colonies.

Comme les germes ne survivent qu'en atmosphère micro-aérophile, les tests de confirmation suivants doivent être réalisés sans délai pour que les germes ne meurent pas.

La morphologie et la mobilité des cultures sont examinées microscopiquement. Pour cela, une coloration de Gram et un état frais sont effectués. A partir des 5 colonies suspectes, celles qui présentent une morphologie incurvée et une mobilité caractéristique en vol de moucheron sont retenues pour les observations ultérieures. Elles sont repiquées sur une gélose Mueller–Hinton au sang (MH) (cf annexe II), que l'on incube en micro-aérophilie pendant 24 à 48 heures dans une étuve réglée à 37°C . Les essais biochimiques sont réalisés à partir des cultures ainsi obtenues.

La croissance à 25°C est testée par l'inoculation d'un bouillon Brucella (cf annexe II) par les souches isolées sur MH et que l'on incube à 25°C en atmosphère micro-aérophile pendant 48 heures. La présence d'un trouble indique la croissance des bactéries.

II – 1 – 4 – Confirmation biochimique

La recherche de l'oxydase et de la catalase est effectuée pour la confirmation du genre après un examen microscopique. *Campylobacter* est une bactérie qui ne fermente pas le sucre, un test est effectué par la culture sur une gélose TSI (Gélose au citrate de fer (III) et aux 3 sucres) en pente (cf annexe II).

- Recherche de l'oxydase

La recherche d'oxydase est d'une grande importance pour la recherche des bacilles Gram négatifs. Le réactif utilisé est l'oxalate de diméthylparaphénylène diamine. Une colonie pure est prélevée à l'aide d'un ensemenceur puis déposée sur un papier buvard imbibé par une ou deux gouttes du réactif. La présence de l'oxydase se manifeste par l'apparition d'une couleur violette (figure 6).



Figure 6 : Oxydase positif (Andrianaivoravelona, D., 2011)

- Recherche de catalase

La détection de l'activité catalase se fait en prélevant une colonie sur un milieu gélosé et en la mélangeant doucement dans une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène. L'apparition dans l'immédiat de bulles d'oxygène indique la présence de catalase (figure 7).



Figure 7 : Catalase positif (Andrianaivoravelona, D., 2011)

- Culture en gélose TSI

La fermentation des sucres et la production de sulfure d'hydrogène se vérifient par la culture sur une gélose TSI = Gélose au citrate de fer (III) et aux 3 sucres. La pente est inoculée par des stries longitudinales et le fond de la gélose (le culot) par une piqûre profonde centrale. L'incubation se fait en atmosphère micro-aérophile à 42°C pendant 24 à 48 h. L'interprétation des résultats est indiquée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Interprétation des résultats de gélose TSI : (source : document qualité LHAE)

Apparence	Interprétation
Culot :	
Jaune	Glucose-positif (fermentation du glucose)
Rouge ou inchangé	Glucose-négatif (pas de fermentation du glucose)
Noir	Formation de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)
Bulles ou fissures	Production de gaz à partir du glucose
Pente :	
Jaune	Lactose et/ou saccharose positifs (1 ou les 2 sucres utilisé(s))
Rouge ou inchangée	Lactose et saccharose négatifs (aucun sucre utilisé)

Après les examens microscopiques et biochimiques, la présence du germe *Campylobacter* est confirmée si les résultats montrent les caractéristiques résumées dans le tableau 2

Tableau 2 : Tests de confirmation du genre *Campylobacter* pour les espèces thermotolérantes : (source : document qualité LHAE)

Test de confirmation	Résultats pour les <i>Campylobacter</i> thermotolérants
Morphologie	Petits bacilles incurvés (Gram négative)
Mobilité	Caractéristique (forte mobilité en vrille)
Oxydase	+
Catalase	+
Glucose (TSI)	-
Lactose (TSI)	-
Saccharose (TSI)	-
Gaz (TSI)	-
Production d'H ₂ S (TSI)	(traces de noircissement possibles en présence de <i>C.coli</i>)
Culture à 25° C	-

+ : positif ; - : négatif

II – 1 – 5 – Confirmation de l'espèce

Selon l'espèce à laquelle elle appartient, le germe *Campylobacter* thermotolérant a une faculté de résistance à certains antibiotiques. Cette dernière est déterminée à partir d'un antibiogramme qui est une technique de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques.

L'identité de l'espèce peut être confirmée par la résistance à l'acide nalidixique et à la céphalotine suivie d'une recherche d'hydrolyse de l'hippurate. Ce dernier est un test utilisé chez les microorganismes pour révéler l'action d'une enzyme capable d'hydrolyser l'hippurate de sodium.

- Recherche de la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céphalotine

Les étapes suivantes sont effectuées pour cet antibiogramme :

- Les colonies sur gélose MH sont ensemencées dans un bouillon Brucella à l'aide d'une anse, pour réaliser une suspension de densité 0,5 sur l'échelle de Mac Farland.
- une dilution de cette suspension est effectuée au 1/10ème dans le même bouillon
- la surface d'une de gélose MH est inondée avec cette suspension diluée.
- un repos de 5 mn est donné, puis l'excès de suspension est rejeté.
- les boîtes sont séchées à l'étuve 37°C pendant 10 mn.
- à la surface de la gélose un disque d'acide nalidixique et un disque de céphalotine sont déposés.
- les boîtes sont ensuite incubées à 37°C en atmosphère micro-aérophile pendant 24h.
- la croissance bactérienne est interprétée comme suit :

Une croissance au contact du disque est classée comme résistante (figure 17).

Une présence d'une zone d'inhibition, même infime, de la croissance est considérée comme sensible (figure 17).

- Recherche de l'hydrolyse de l'hippurate

Sa détection se fait en mettant en suspension, une colonie dans 400 µl d'une solution d'hippurate de sodium à 1 %, à l'aide d'un ensemenceur (attention de ne pas incorporer d'agar). L'incubation s'effectue à 37°C pendant 2 h, puis 200 µl de solution de ninhydrine est ajouté lentement sur le côté du tube de manière à former une couche supérieure. Les tubes de réactions sont incubés de nouveau à 37°C pendant 10 min pour pouvoir interpréter les résultats. La réaction positive se manifeste par l'apparition d'une couleur violette

sombre/bleue. La réaction négative se traduit par l'absence de changement de couleur ou une coloration grise (figure 8).

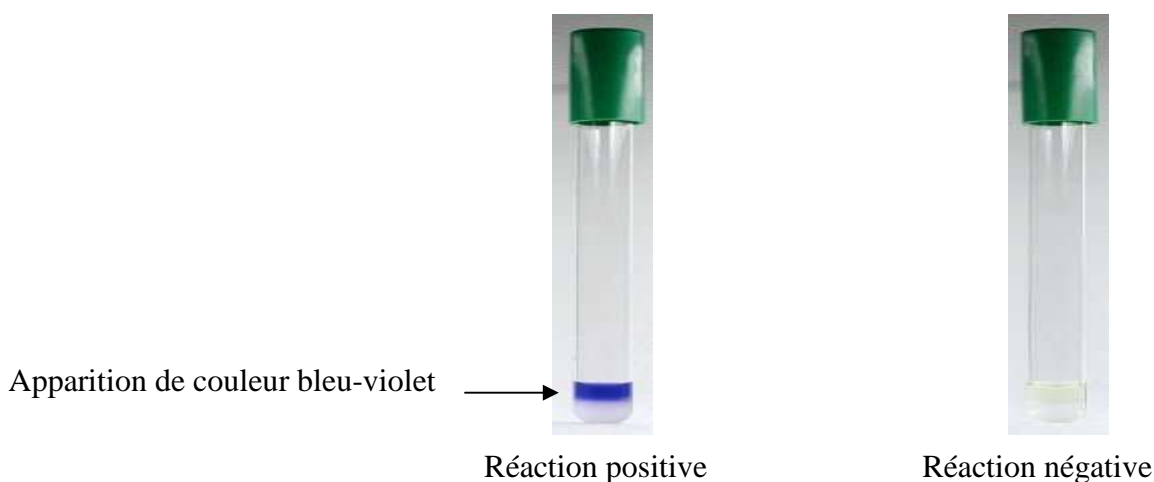


Figure 8 : Hydrolyse de l'hippurate de sodium (Oxoid Microbiology product)

Parmi les espèces de *Campylobacter* spp. poussant à 42°C, les plus fréquemment rencontrées sont *C. jejuni* et *C. coli*. Cependant d'autres espèces sont rarement signalées. D'ordinaire, *C. jejuni* peut être différencié des autres espèces sur la base de l'hydrolyse de l'hippurate car c'est la seule espèce positive pour ce type de test. Toutefois, l'existence de souches de *C. jejuni* négatives pour le test de l'hippurate a été révélée au cours de certaines études (Steinhauserova *et al.*, 2001). Le tableau 3 indique quelques caractéristiques des espèces les plus importantes de *Campylobacter* thermotolérant

Tableau 3 : Caractéristiques de *Campylobacter* thermotolérant (source : document qualité LHAE)

Caractéristiques	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>
Croissance à 25°C	-	-	-	-
H ₂ S (TSI) ¹	-	(+)	-	-
Acide nalidixique	S	S	R	S
Céphalotine	R	R	R	S
Hydrolyse de l'hippurate	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	- ou faible
Légende : + : positif ; - : négatif ; (+) : faiblement positif ; S : sensible ; R : résistant				
1 : faible développement d'H ₂ S dans l'eau de condensation au bout de 5 jours.				

II – 1 – 6 – Conservation des souches

Après la confirmation, les souches issues d'une culture pures sont récupérées et conservées dans un milieu spécialisé appelé « skim milk » (cf annexe II), qui convient parfaitement à la conservation des bactéries exigeantes. Après l'ensemencement et l'étiquetage (référence échantillon et date) les « skim milk » sont conservés à une température de -80°C .

La figure 9 récapitule les étapes importantes de la recherche de *Campylobacter*.

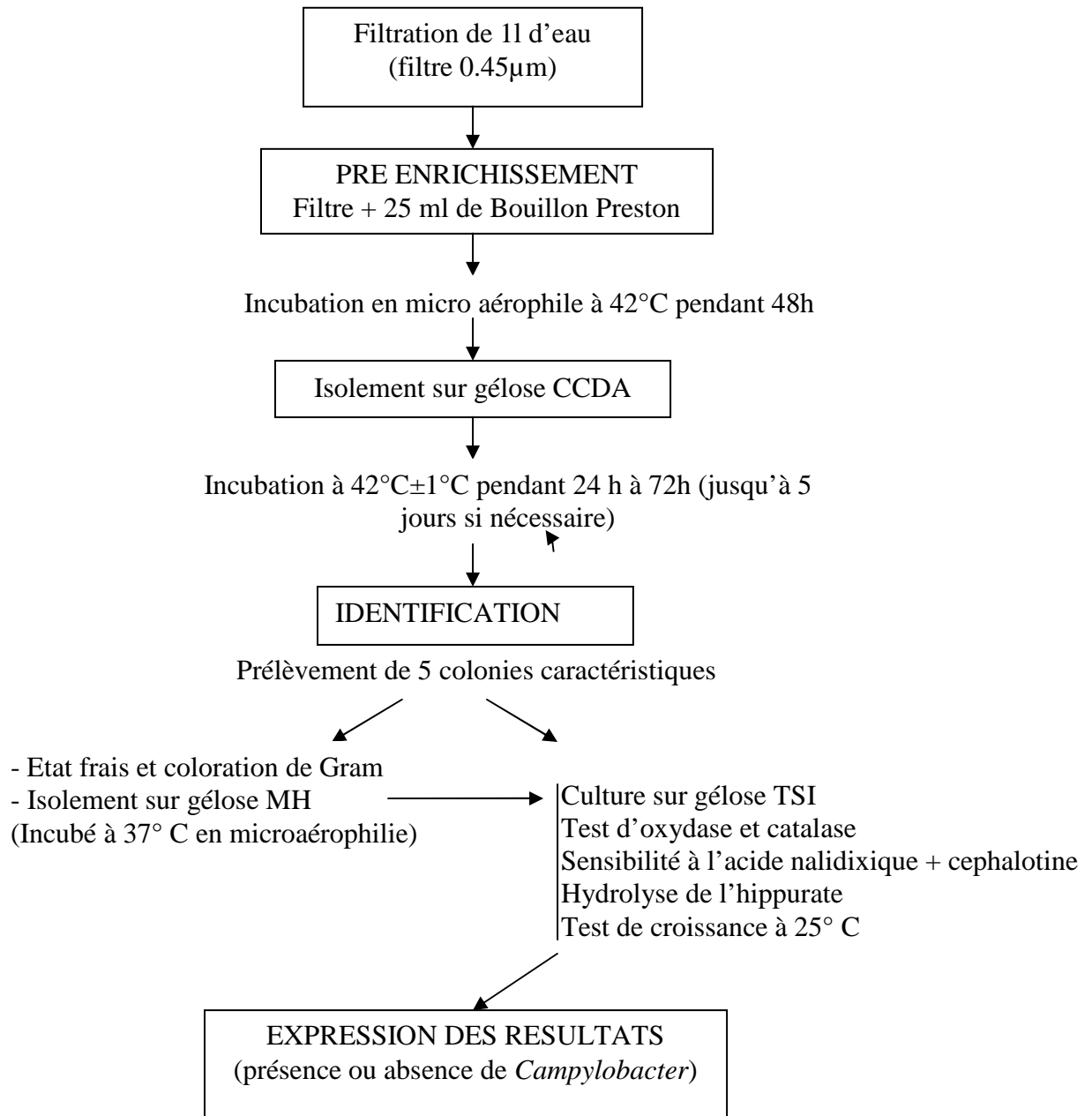


Figure 9 : Schéma récapitulatif de la recherche de *Campylobacter*

II – 2 – Analyse de la qualité de l'eau

La qualité microbiologique de l'eau est reflétée par sa charge en bactérie, cette charge bactérienne donne une appréciation sur la pollution de l'eau destinée à être consommée.

La Flore Totale Mésophile Aérobie (FTMA) constitue l'ensemble des microorganismes aptes à se développer sur une gélose ordinaire pour un dénombrement à la température de 36° C et 22°C. Elle englobe les microbes pathogènes et les microbes d'altération. Ainsi, un échantillon à valeur en FTMA élevé peut indiquer une probabilité d'altération microbienne rapide ou une infection par des bactéries pathogènes. Elle est un indicateur microbiologique qui permet d'évaluer la charge bactérienne globale présente dans un échantillon. Le dénombrement des microorganismes revivifiants reste la meilleure méthode d'appréciation de la qualité microbiologique de l'eau (Rakotoniaina, 2005).

La recherche des microorganismes aérobies dits "revivifiants" permet de dénombrer les bactéries se développant dans des conditions habituelles de culture. Elle représente la teneur moyenne en bactéries d'une ressource naturelle. Sous certaines conditions, ces germes peuvent générer des problèmes de santé. Ce sont des indicateurs qui révèlent le degré d'une contamination bactérienne globale.

La qualité de l'eau est ainsi analysée pour avoir un aperçu de la quantité de microorganismes présente dans l'eau consommée par les villageois. Pour cela, la norme EN ISO 6222 pour le dénombrement des microorganismes revivifiants est adoptée. Ces derniers sont toutes des bactéries aérobies, de la levure ou de la moisissure, capables de former des colonies dans un milieu spécifié.

II – 2 – 1 – Principe

Le principe consiste à ensemer dans une gélose à l'extrait de levure coulée en boîtes de Pétri, de volumes mesurés d'un échantillon d'eau ou de ses dilutions, que l'on incube à 22° C et à 36° C respectivement pendant 68±4 heures et 44±4 heures. Le calcul du nombre d'Unités Formant de Colonie (UFC) par ml d'échantillon se fait ensuite à partir du nombre de colonies formé dans le milieu suivant la formule suivante, et les valeurs admissibles figurent dans le tableau 4.

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{nombre de colonies dénombré}}{\text{volume ensemené} \times \text{dilution décimale}}$$

II – 2 – 2 – Préparation des échantillons

Les échantillons étudiés ont été dilués avec de l'eau distillée jusqu'à une dilution au $100^{\text{ème}}$. Dans le cas présent, les dilutions au $10^{\text{ème}}$ et au $100^{\text{ème}}$ ont étéensemencées pour obtenir à la fin de l'incubation des colonies comptables.

Pour procéder au dénombrement des microorganismes revivifiables, la figure 10 récapitule les étapes à suivre.

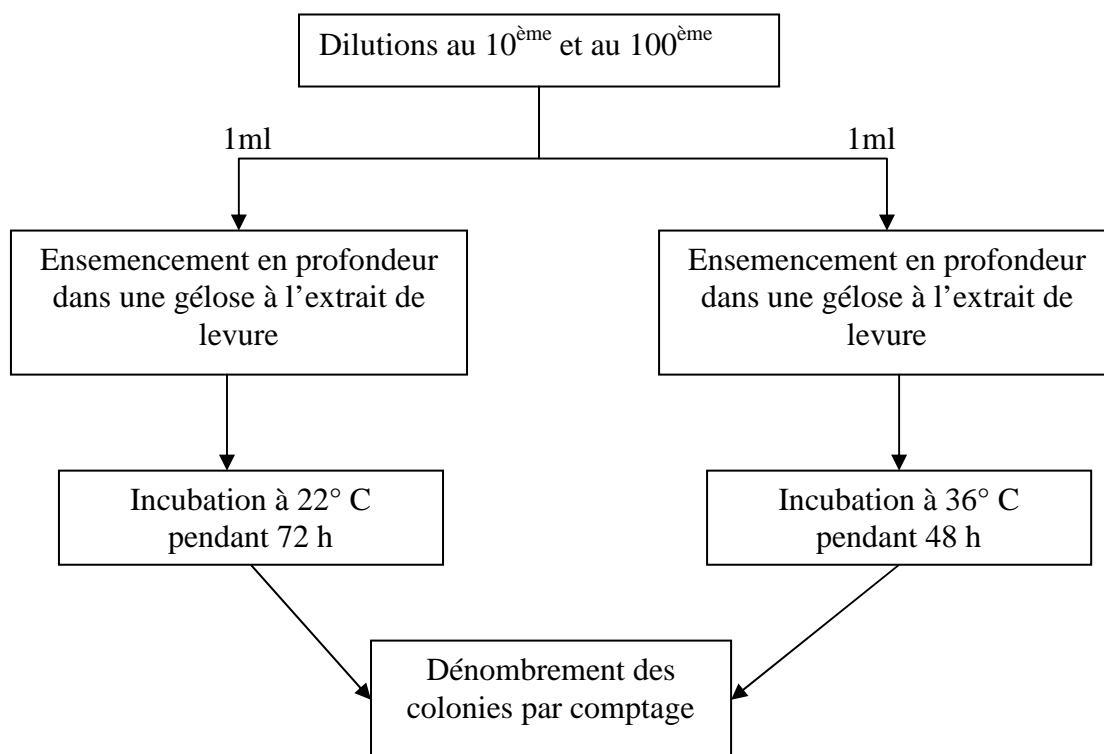


Figure 10 : Schéma récapitulatif du dénombrement des FTMA

II – 2 – 3 – Valeurs maximales admissibles

Selon les normes établies par l'AFNOR, les valeurs maximales admissibles de FTMA sont récapitulées dans le tableau 4

Tableau 4 : Valeurs maximales admissibles de FTMA

	Valeurs admissibles
Microorganismes revivifiables à 36° C	20 UFC / ml
Microorganismes revivifiables à 22° C	100 UFC / ml

UFC : Unité Formant des Colonies

III – Méthode d'analyse moléculaire

La confirmation de genre et d'espèce *Campylobacter*, par une méthode moléculaire, a été effectuée par le Laboratoire d'Epidémiologie-Surveillance (LES) par Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex (Yamasaki Matsune *et al.*, 2007) en point final (PCR conventionnelle). L'extraction des Acides désoxyribonucléiques (ADN) a été effectuée avec le kit d'Instagene (Bio Rad).

III – 1 – Généralités sur la méthode de PCR

La PCR est une méthode permettant la multiplication d'un court brin d'ADN appelé séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique. La séquence cible est multipliée par synthèses successives à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et d'une ADN polymérase thermostable. Chaque synthèse ou cycle de PCR est constituée de 3 étapes constituées de trois plateaux de température différents : dénaturation, hybridation des amorces et polymérisation, figure 12.

III – 1 – 1 – Dénaturation

Elle constitue la première phase d'un cycle de la réaction, et se déroule généralement à une température de 95° C. Sous l'action de la chaleur, l'ADN double brin perd sa configuration et devient simple brin par la rupture des liaisons hydrogènes.

III – 1 – 2 – Hybridation des amorces

La deuxième phase est constituée par l'appariement des amorces avec les brins d'ADN séparés précédemment, les amorces sont des oligonucléotides de courte séquence servant à initier la polymérisation. Généralement, la phase d'hybridation se déroule à une température aux environs de 55-60° C.

III – 1 – 3 – Elongation ou la polymérisation

La troisième phase d'un cycle est la polymérisation proprement dite, il s'agit de la synthèse du brin complémentaire de l'ADN de départ à partir des nucléotides présents dans la réaction et grâce à une enzyme qui est l'ADN polymérase. La polymérisation se déroule généralement à 72° C.

La réaction de PCR est une succession de plusieurs cycles de PCR, figure 11, pour une amplification exponentielle de l'ADN cible. Les produits de l'amplification sont ensuite révélés au bromure d'éthidium (BET), mesurés et séparés par électrophorèse.

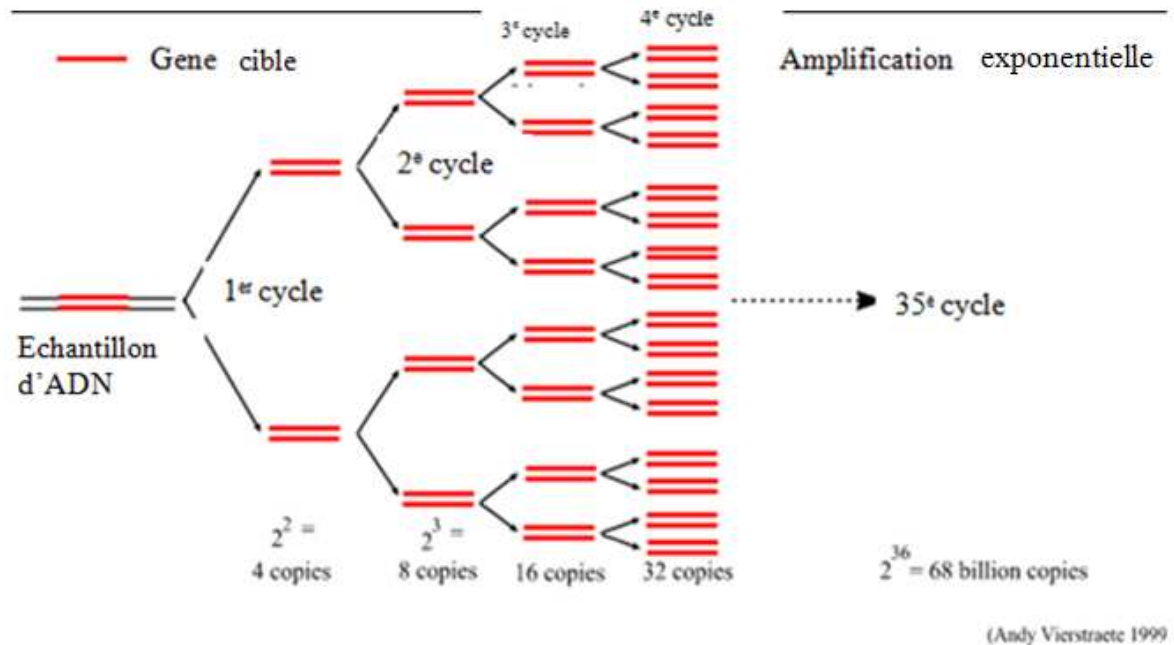


Figure 11 : Schéma de la réaction de PCR sur plusieurs cycles (Vierstarcte, A., 1999)

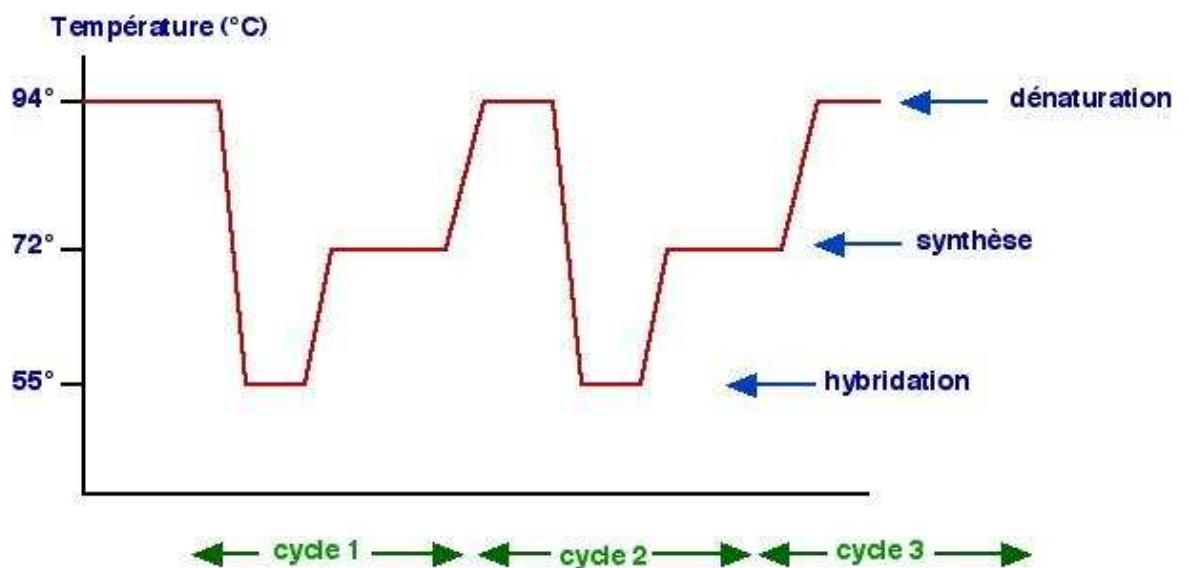


Figure 12 : Plateaux de température des cycles de PCR (Mornet, E., 2011)

III – 2 – Principe de la PCR multiplex

Le principe de la PCR multiplex est basé sur l'amplification, en une seule réaction, de deux ou plusieurs fragments d'ADN cible différents (Bogard *et al.*, 2005). La PCR multiplex combine dans une seule réaction, un ensemble d'amorces pouvant produire des amplicons de différentes tailles. Ils sont spécifiques des séquences d'ADN cible différentes. Après la réaction, les produits de la polymérisation seront séparés par électrophorèse pour déterminer la taille en paire de bases (pb) des produits de la PCR et discerner les différentes bandes, correspondant respectivement à la taille des séquences cibles. A partir du gel de l'électrophorèse, on peut ainsi lire la présence des produits de la polymérisation de la séquence d'ADN cible.

Pour la confirmation d'espèce de *Campylobacter*, les conditions adoptées pour la réaction de PCR multiplex par le LES sont celles décrites par Yamasaki Matsune *et al.*, en 2007. Cette analyse permet de déterminer en une seule réaction l'identité de six espèces, appartenant au genre *Campylobacter*, reconnues comme étant les principales espèces responsables des maladies gastro-intestinales. Ces espèces sont les suivantes : *C. jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsaliensis*, *C.fetus*, *C.hyointestinalis*.

III – 3 – PCR conventionnelle

La PCR conventionnelle consiste à une réaction d'amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique. Les amplicons ne sont mesurés qu'à la fin de la réaction. Les produits de la réaction sont révélés par le BET et sont séparés par électrophorèse. La réaction PCR est effectuée au moyen d'un thermocycleur (BIOMETRA 3 000 ou T Gradient) du LES de l'Institut Pasteur de Madagascar. Les conditions de la réaction figurent dans le tableau 5.

Tableau 5 : Conditionnement du thermocycleur Biometra 3 000

	Température	Temps
Polymérase activation	95°C	1 min
Dénaturation	95°C	2 sec
Hybridation	60°C	20 sec
Polymérisation	72°C	0 sec

Les concentrations initiales du mix de la PCR multiplex sont indiquées dans le tableau 6

Tableau 6 : Différentes concentrations du mix réactionnel PCR.

	Tampon d'amplification	MgCl ₂	dNTPs	Primer mix-genre	Primer mix- espèce	Taq polymérase
[]	1 X	3 mM	200 µM	0,2 µM	0,2 µM	1 U/ 25 µl

Dans chaque tube de réaction, la PCR est réalisée dans un volume final de 25µl contenant :

- 2 µl de prise d'essai d'extrait d'ADN à amplifier
- 2,5 µl de Primer-mix genre
- 2,5 µl de Primer-mix Multiplex-6-CAMPYLOBACTER à 2 µM chacun
- 11,3 µl d'eau de qualité PCR
- 2,5 µl de tampon à 1X
- 1,5 µl de MgCl₂
- 0,2 µl de Taq Polymérase

III – 4 – Extraction de l'ADN

Les colonies de *Campylobacter* isolées sur gélose MH serviront pour l'extraction d'ADN à l'aide d'InstaGene Matrix (Bio-Rad). Ce produit permet une simple et rapide préparation de l'ADN pour une réaction de PCR. Il contient des billes de chelex qui absorbent les débris cellulaires. Les billes fixent les impuretés issues de la lyse cellulaire qui pourraient interférer lors de l'amplification.

Deux ou trois colonies sont incorporées dans 200µl d'Instagene, qui ensuite est incubé dans un bain-marie à sec pendant 10 minutes à 56° C, puis pendant 20 minutes à 100° C. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3 000 g, à température ambiante. Le surnageant servira d'extrait d'ADN prêt à l'emploi et à conserver à une température de -20° C pour ne pas abimer l'ADN.

III – 5 – Primers ou amorces

Les références des amorces utilisées dans la PCR multiplex sont décrites dans le tableau 7. Et la figure 13 montre les différentes bandes en paire de bases (pb) sur le gel d'électrophorèse.

Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR Multiplex et les tailles en paire de bases (pb) des produits PCR (source : Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007)

Species	Size (bp)	Target gene	GenBank accession no.	Primer	Sequence (5' to 3')	Reference or source
Genus <i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	AL111168	C412F	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'	Linton <i>et al.</i> (1996)
				C1228R*	5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'	Linton <i>et al.</i> (1996)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	X67761	HYO1F	5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'	Inglis & Kalischuk (2003a)
				HYOFET23SR	5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3'	Inglis & Kalischuk (2003a)
<i>C. coli</i>	502	<i>askI</i>	AF017758	CC18F	5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3'	Linton <i>et al.</i> (1997)
				CC519R	5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'	Linton <i>et al.</i> (1997)
<i>C. fetus</i>	359	<i>cstA</i>	AY158813	MG3F	5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3'	Hum <i>et al.</i> (1997)
				CF359R	5'-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'	This study†
<i>C. lari</i>	251	<i>glyA</i>	AF136495	CLF	5'-TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3'	Wang <i>et al.</i> (2002)
				CLR	5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>C. jejuni</i>	161	<i>cj0414s</i>	AL111168	C-1	5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'	Wang <i>et al.</i> (1992)
				C-3	5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'	Wang <i>et al.</i> (1992)
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxA</i>	AY598996	CU61F	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'	This study
				CU146R	5'-TTCTAGCCCCCTTGCTTGATG-3'	This study

Les puits 1 et 2 sont des témoins négatifs, 3 correspond à *C.upsaliensis*, 4 et 5 conviennent à *C.jejuni*, la souche 6 concorde à *C.lari*, 7 et 8 correspondent à *C.fetus*, 9 représente la souche *C.coli* et 10 appartient à l'espèce *C.hyointestinalis*. Les souches 11 à 14 s'avèrent être des souches *Campylobacter* par la présence de la bande 816 pb, mais la séquence définissant l'espèce ne figure pas parmi les 6 amorces spécifiques utilisées.

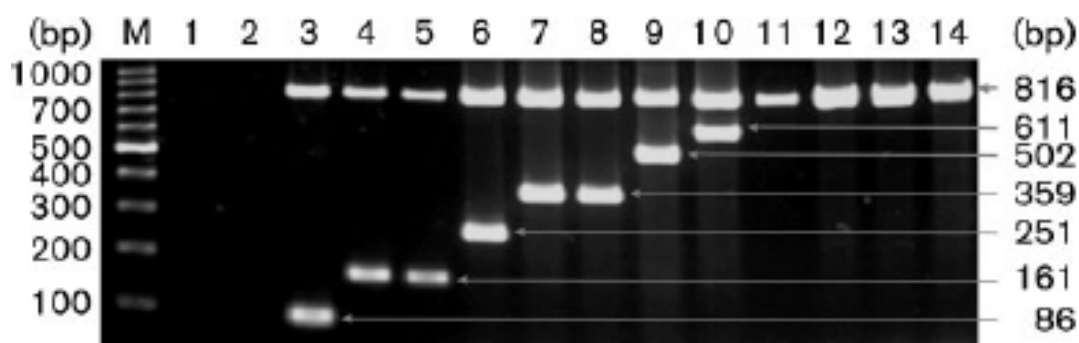


Figure 13 : Gel d'électrophorèse avec les différentes tailles en paires de bases des amplicons (Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007)

IV – Méthode d'analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, différents tests ont été utilisés pour faire ressortir les significations des résultats.

IV – 1 – Test chi-deux d'indépendance

Le logiciel utilisé pour ce type de test est le logiciel libre de statistique « R commander », version 2.13.1. Cette analyse se base sur un test d'indépendance entre deux variables qui sont les catégories d'eau et la présence ou l'absence du germe. La formule est la suivante :

$$X^2 = \sum \frac{(O_i - C_i)^2}{C_i}$$

Avec un degré de liberté (ddl ou df) = $k-1$

O_i = effectif observé

C_i = effectif calculé

k = nombre de catégories

IV – 2 – Fréquence des échantillons positifs

La fréquence des échantillons positifs permet de ressortir le taux d'isolement du germe et se fait selon le calcul suivant :

$$\text{Fréquence} = \frac{\text{nombre de positifs}}{\text{nombre d'échantillons}} \times 100$$

IV – 3 – Régression linéaire

La régression linéaire est un ajustement de modèles pour faire ressortir une éventuelle corrélation entre deux variables qui sont la charge microbienne et la présence du germe dans les échantillons d'eau.

PARTIE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATIONS


En rapport avec les matériels et méthodes, les résultats se rapportent plus aux travaux effectués en laboratoires.

I – Sites de prélèvements

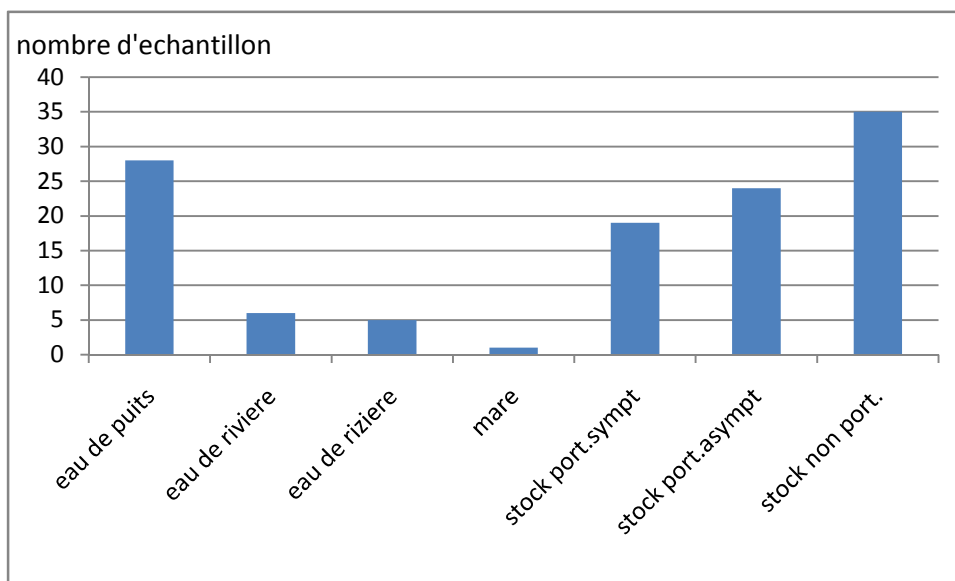
Etant rattaché à l'étude de l'exposition environnementale des enfants dans la zone de Moramanga, le choix des prélèvements a été effectué par l'équipe de l'Unité Epidémiologie de l'Institut Pasteur de Madagascar. Ce type d'échantillonnage est relatif à l'étude sur l'exposition environnementale infantile.

Les 10 hameaux de la zone rurale de Moramanga, faisant l'objet de prélèvement d'eau sont récapitulés dans le tableau 8 :

Tableau 8 : Lieux de prélèvement des eaux de boisson.

Hameaux	catégorie d'eau	nombre d'échantillons
Ambohimananarivo	eau de puits	04
Ambohimadana	eau de puits	01
	eau de rivière	01
Ambohinierenana	eau de rivière	01
	eau de rizière	02
	eau de puits	02
Ambohitranivo	eau de rivière	01
	eau de puits	03
Ambonidobo	eau de rivière	01
	eau de puits	02
Ampitambe	eau de puits	05
Ankazondandy	eau de rivière	01
	eau de rizière	01
Antanambao	eau de puits	04
Befotsy	eau de puits	03
Beontsa	mare	01
	eau de rivière	01
	eau de rizière	02
	eau de puits	05
	Eau de stockage des ménages	78
TOTAL	Rapport-gratuit.com LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES 	118

Un total de 118 échantillons a été prélevé dont 40 proviennent des points d'eaux collectifs : avec 28 eaux de puits, 6 eaux de rivière, 5 eaux de rizière et 1 eau de mare. 78 échantillons provenant des eaux de stocks de ménage de cette même zone ont également été prélevés. Ces derniers échantillons regroupent des eaux de stock chez des foyers porteurs symptomatiques, chez des foyers porteurs asymptomatiques et enfin chez des foyers non porteurs du germe. La répartition en nombre de chaque catégorie d'eau est représentée sur la figure 14.



Stock port.sympt. : stock d'eau chez les foyers porteurs symptomatiques du germe ; **stock port.asympt.** : stock d'eau chez les foyers porteurs asymptomatiques ; **stock non port.** : stock d'eau chez les foyers non porteurs du germe.

Figure 14 : Répartition en nombre de chaque catégorie d'eau

II – Analyse microbiologique

II – 1 – Recherche de *Campylobacter*

Après l'enrichissement sélectif dans du bouillon Preston, les isollements sur CCDA ont donné différentes colonies qui, pendant les examens microscopiques et biochimiques, n'ont pas été de *Campylobacter*. Plusieurs non-*Campylobacter* ont poussé sur CCDA et ont donc résisté aux antibiotiques ajoutés au bouillon lors de l'enrichissement ainsi qu'à ceux présents dans le CCDA.

- Aspect des colonies présumptives

Les isollements du *Campylobacter* sur les boîtes CCDA ont donné des colonies de taille variable (petites, moyennes et étalées), de couleur grise et des fois avec un pourtour irrégulier. La figure 15 montre les colonies susceptibles d'être de *Campylobacter*.



Figure 15 : Isolement de *Campylobacter* sur CCDA.

(Andrianaivoravelona, D., 2011)

Des souches de *Campylobacter* ont été isolées à partir des échantillons d'eau de boisson de la zone rurale de Moramanga, la présence a été révélée mais uniquement dans une minime partie des prélèvements effectués.

- Observation microscopique :

Campylobacter est une bactérie bacilles gram négatifs dont la morphologie est spiralée en forme de « S ». Au microscope optique, les cellules se présentent comme indiquée dans la figure 16,

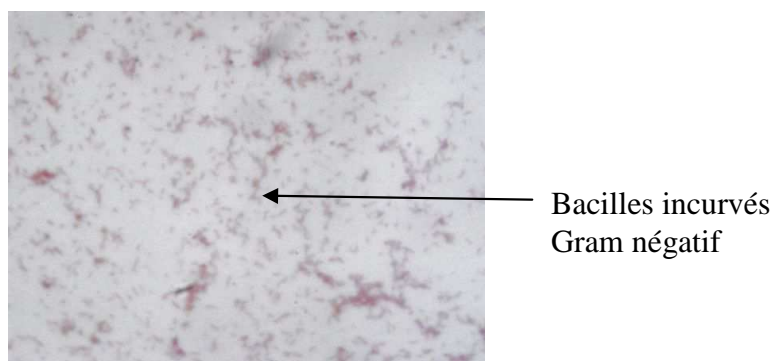


Figure 16 : *Campylobacter* vu au microscope optique à fort grossissement 10 x 100

(Andrianaivoravelona, D., 2011)

La sensibilité à l'acide nalidixique et la résistance au céphalotine sont montrées sur la figure 17, montrant un rayon bien distinct pour la sensibilité. La figure montre bien que le germe est sensible et ne pousse pas sur un rayon autour de l'acide nalidixique.

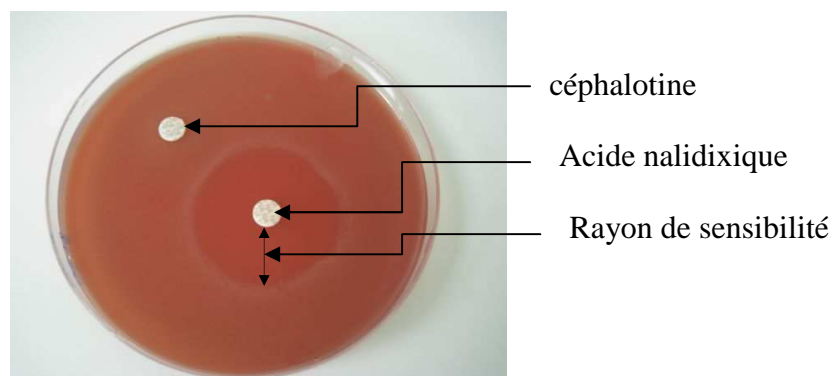


Figure 17 : Antibiogramme à l'acide nalidixique et à la céphalotine
(Andrianaivoravelona, D., 2011)

La recherche de *Campylobacter* a démontré la présence de trois souches, isolées à partir des eaux de boisson

Les résultats des tests biochimiques des souches isolées à partir des eaux de boisson sont résumés dans le tableau 9 :

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats positifs

Tests	résultats		
	Souche 1	Souche 2	Souche 3
Oxydase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Culture sur TSI	-	-	-
Sensibilité à l'acide nalidixique	S	S	S
Sensibilité à céphalotine	R	R	R
Hydrolyse d'hippurate	-	-	-

+ : positif ; - : négatif ; S : sensible ; R : résistant

D'après les tests effectués, les souches de *Campylobacter* qui se sont avérées positives appartiennent à l'espèce *C.coli*

Parmi les points d'eaux collectifs, des eaux de puits ont été contaminées par *Campylobacter* dans les hameaux d'Ambohinierenana et d'Ambohimanarivo. Le troisième positif était isolé d'un échantillon d'eau de stock d'un foyer ayant eu une manifestation de diarrhée à *Campylobacter*.

II – 2 – Analyse de la qualité de l'eau

Le nombre d'Unité Formant de Colonies (UFC) par millilitre et calculé après le dénombrement représente une valeur qui reflète la charge microbienne de l'échantillon.

II – 2 – 1 –Dénombrement des colonies

Les résultats de dénombrement sont représentés dans le tableau A (annexe I).

Le dénombrement sur le milieu à l'extrait de levure est effectué à partir de la dilution au 100^{ème}. Les figures 18 et 19 montrent la valeur de la charge microbienne de chaque échantillon.

Le résultat a révélé que le nombre de colonies montre en moyenne une valeur estimée à $175,69.10^2$ UFC/ ml pour, les valeurs sont réparties entre 1.10^2 et 930.10^2 UFC/ ml pour les microorganismes revivifiants à 36° C. La valeur tolérée étant de 20 UFC/ml.

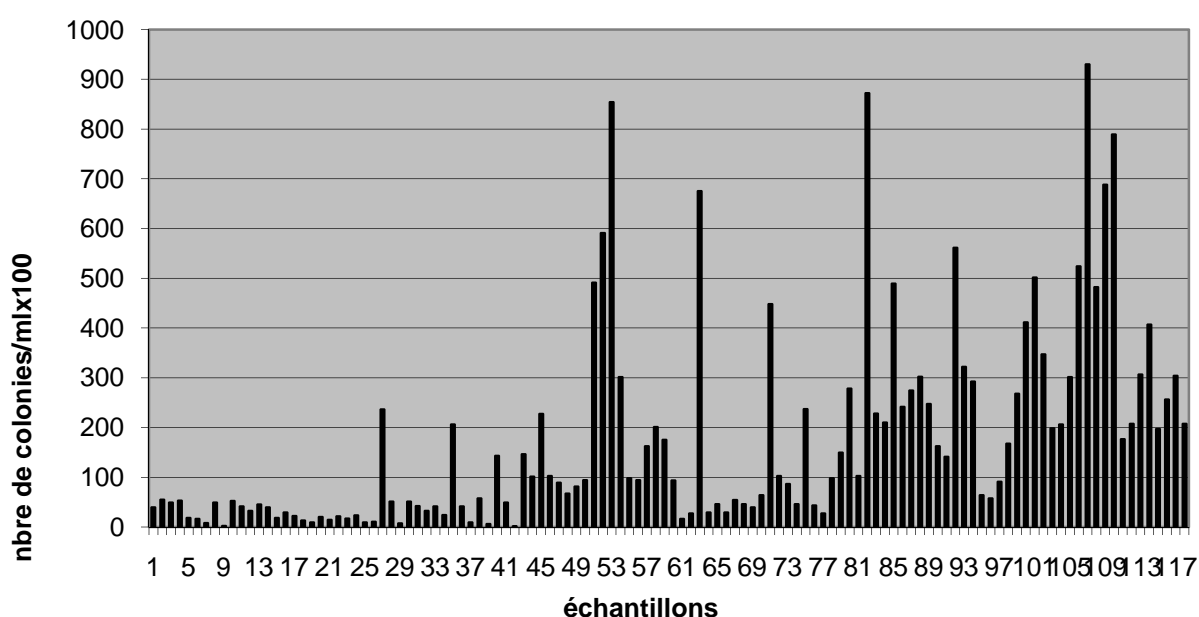


Figure 18 : Nombre de colonies x 10² se développant à 36° C pour chaque échantillon

Pour les colonies se développant à 22° C, la moyenne est estimée à $212,62.10^2$ UFC/ml dont les valeurs sont comprises entre 1.10^2 et 1502.10^2 UFC/ml. La valeur tolérée étant de 100 UFC/ml.

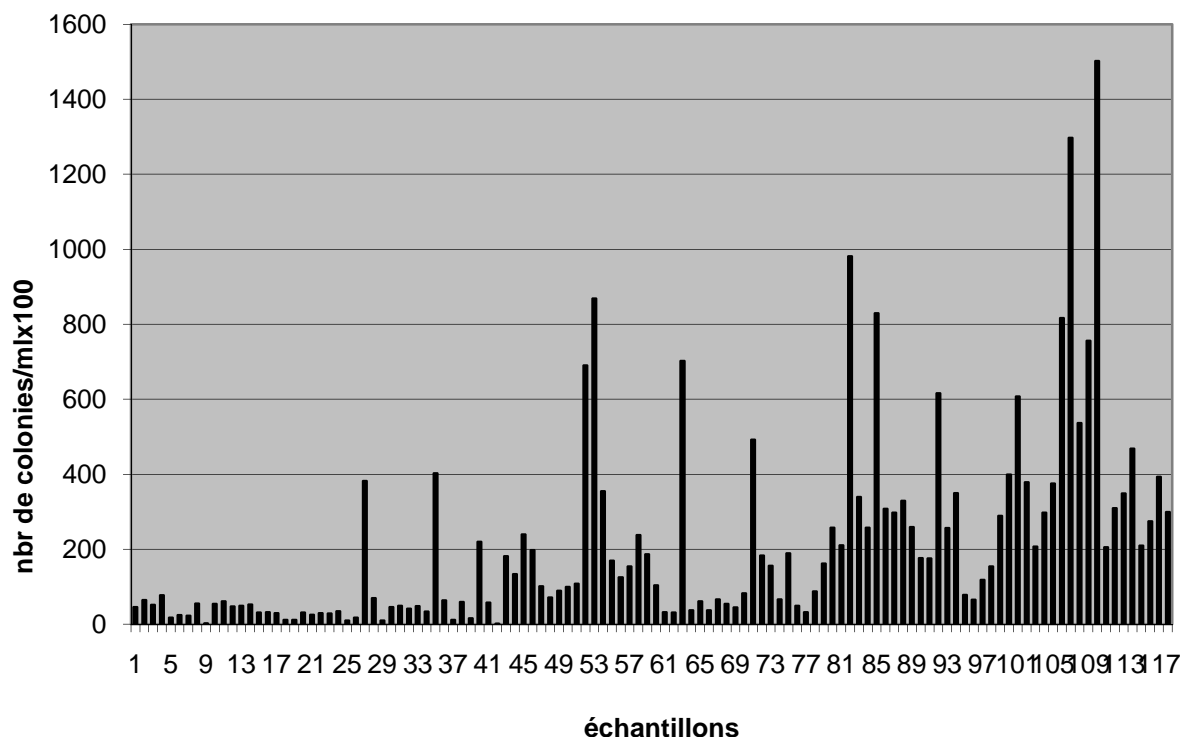


Figure 19 : Nombre de colonies x 10^2 se développant à 22° C pour chaque échantillon

Il est quand même important de noter que les valeurs extrêmes influent la valeur de la moyenne. Le dénombrement des colonies issues de l'inoculation des échantillons d'eau de boisson, de la zone rurale de Moramanga, dépasse largement les seuils d'acceptabilité d'une eau destinée à la consommation qui sont de 20 UFC et 100 UFC pour les incubations respectives à 36° C et 22° C.

II – 2 – 2 – Aspect des colonies

Une gamme de colonies de tailles variables a été obtenue (petites, moyennes, et grandes), de couleurs différentes (blanches, jaune, crème, crème foncé et transparente), et de forme circulaire, avec un pourtour régulier ou irrégulier.

III – Analyse moléculaire

La confirmation moléculaire effectuée au LES a donné le résultat représenté dans la figure 20. Ce gel d'électrophorèse montre la présence du genre *Campylobacter* par la

bande à 816 pb pour les 11 échantillons, dont les trois dernières (9,10 et 11) correspondent aux souches isolées à partir des eaux de boisson. Les puits 7 et 8 sont des témoins négatifs et les puits 1, 2, 3, 4, 5 et 6 sont respectivement *C.fetus*, *C.lari*, *C.jejuni*, *C.coli*, *C.hyointestinalis* et *C.upsaliensis*. D'après les témoins positifs, les trois souches isolées appartiennent à l'espèce *C.coli*.

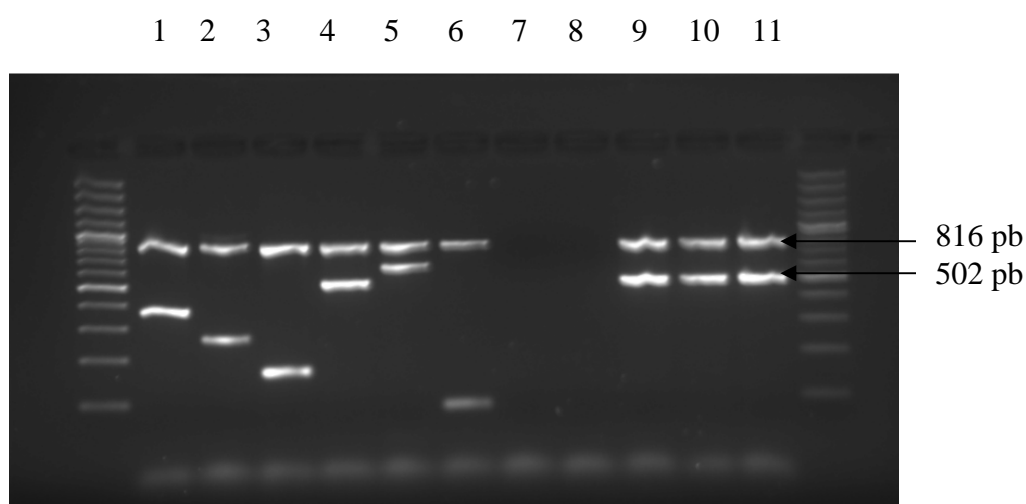


Figure 20 : Gel d'électrophorèse (LES, Institut Pasteur de Madagascar, 2013)

IV – Analyses statistiques

IV – 1 – Dépendance entre la présence du germe et les catégories d'eau

Les échantillons positifs des différentes catégories d'eau sont regroupés dans le tableau10:

Tableau 10 : Nombre de présence et/ou d'absence du germe selon les catégories d'eau

Catégories	Nombre de Présence	Nombre d'Absence	Totaux
Eau de puits	2	26	28
Eau de rivière	0	6	6
Eau de rizièrè	0	5	5
Mare	0	1	1
Stock chez les porteurs symptomatiques	1	18	19
Stock chez les porteurs asymptomatiques	0	24	24
Stock chez les non porteurs.	0	35	35
Totaux	3	115	118

Après une analyse de Pearson's Chi-squared test, un test chi-deux d'indépendance, les valeurs suivantes ont été obtenues:

X-squared = 4.8116, df = 6, p-value = 0.5682

Soit l'hypothèse nulle H_0 est l'indépendance entre les deux variables "catégories d'eau" et "nombre de présence/absence"

La valeur de la probabilité est de $0.5682 > 0.05$ donc l'hypothèse nulle est rejetée soit le nombre de la présence et/ou l'absence du germe est dépendant des catégories d'eau.

IV – 2 – Fréquence d'isolement du germe

Sur 118 échantillons d'eaux en provenance de Moramanga, trois uniquement ont été positifs.

La fréquence d'isolement pour chaque catégorie d'eau est résumée dans le tableau 11

Tableau 11 : Tableau récapitulatif et fréquence des échantillons positifs

Catégorie d'eau	Nombre d'échantillons	Nombre de positif	Fréquence d'isolement (%)
Eau de puits	28	02	7,14
Eau de rivière	6	0	0
Eau de rizière	5	0	0
Mare	1	0	0
Stock chez les porteurs symptomatiques	19	1	5,26
Stock chez les porteurs asymptomatiques	24	0	0
Stock chez les non porteurs.	35	0	0
Totaux	118	3	2,54

La fréquence de rencontre du germe est très faible dans chaque catégorie d'eau bien que la présence du germe est dépendante de cette dernière.

IV – 3 – Analyse de la corrélation entre la présence de *Campylobacter* et la charge microbienne

Le rapport entre la charge microbienne et la présence/absence du germe *Campylobacter* dans les eaux de boissons est reflétée par une courbe de tendance faite à partir d'un nuage de points. Par la méthode de la régression linéaire, la formule de la courbe est ressortie avec le coefficient de corrélation R^2 représentant la dépendance entre ces deux variables. Une valeur de 1 a été donnée pour marquer la présence et 0 pour l'absence. La fonction de la courbe est représentée sur la figure 21.

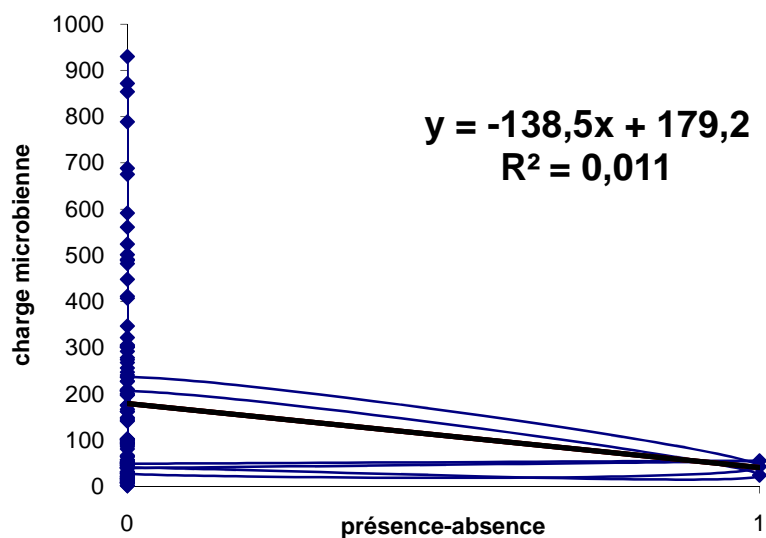


Figure 21 : Corrélation entre la présence de *Campylobacter* et la charge microbienne

X = la présence ou l'absence

Y = la charge microbienne

R^2 = coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation de la courbe de tendance avoisine la valeur zéro, $R^2 = 0.0116$, indiquant qu'il n'existe aucune relation entre ces deux variables. La présence/absence de *Campylobacter* dans l'eau de boisson est indépendante de la charge microbienne.

PARTIE 4 : DISCUSSION

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence la présence de *Campylobacter* dans les eaux de boissons et de dresser un profil de contamination de l'environnement.

I – Fréquence d'isolement du germe

L'existence du germe *Campylobacter* a été révélée dans une faible proportion, dans 2,54% des échantillons d'eaux de boisson prélevées. La contamination environnementale est confirmée par cette présence mais à un niveau restreint. La détection de *Campylobacter* dans l'eau de consommation permet de justifier la circulation de ce germe dans le milieu ambiant. Mais cette minime proportion de contamination laisse supposer qu'il existe d'autres facteurs beaucoup plus pertinents, responsables de l'exposition à l'infection à *Campylobacter*. Néanmoins, dans cette région, l'eau de boisson participe à la transmission de cette maladie bactérienne à l'homme. Il serait judicieux de connaître l'origine de la contamination de ces différents points d'eaux en vue de prendre des dispositions correctives ou préventives. Mais par manque d'informations détaillées sur des états de lieux de prélèvements, les potentielles sources de la contamination de ces eaux ne pourront pas être discernées dans le présent document.

Ce faible taux d'isolement peut être dû au fait que ce germe est fragile nécessitant de nombreuses conditions pour pouvoir le cultiver. D'autant plus que le comportement du germe *Campylobacter* dans l'environnement est encore mal connu (Beumer *et al*, 1992), une perte rapide de sa viabilité sur les milieux de cultures est une supposition, un phénomène associé au développement des formes coccoïdes des cellules bactériennes. Effectivement, dans des conditions environnementales inadéquates, leur physiologie adopte la forme viable mais non cultivable en évoluant à des cellules coccoïdes à cause de nombreux facteurs variables lors de leur passage dans le milieu extérieur (Harvey et Leach, 1998).

De part cette perte rapide de viabilité, il serait judicieux d'éviter de transporter les échantillons sur une longue distance, d'autant plus que les conditions de transports, faute d'équipements adéquats, représentent une limite pour cette étude.

II – *Campylobacter* dans l'eau

Il a été noté dans les résultats que la présence du germe dépendait de la catégorie d'eau. Dans ce cas, les facteurs qui pourraient contaminer ces différentes catégories

devraient être évalués. L'eau est reconnue comme étant une des principales voies de transmission de *Campylobacter* et contribue à augmenter le nombre de cas d'infections sporadiques, le germe *Campylobacter* peut en effet persister dans l'eau dans un état viable mais non cultivable (Baffone *et al.*, 2006). Ces formes viables mais non cultivables sont potentiellement capables de causer des maladies (Rollins et Colwell, 1996), et cet état pourrait expliquer ce faible taux de détection dans les eaux (2,54 %). Il a été démontré que deux souches sur quatre de *Campylobacter* n'étaient plus cultivables après un séjour de 6 semaines dans l'eau (Jones *et al.*, 1991). La forme viable mais non cultivable est une forme de résistance adoptée par le germe pour prolonger sa survie et assurer leur transmission à leur hôte (Harvey et Leach, 1998). Une fois dans l'environnement, beaucoup de bactéries perdent la faculté de pousser sur les milieux habituellement utilisés (Blackburn and McCarthy, 2000 ; Ward *et al.*, 1990). L'étude des formes dites VBNC ou VNC (Viables But Non Culturable) c'est à dire ne formant pas de colonies est un domaine actif de la recherche (Barer and Harwood, 1999 and Kell *et al.*, 1998). Des changements métaboliques sont observés dans lesquels ces cellules ne poussent plus, mais gardent un potentiel de membrane ainsi que des activités métaboliques (Besnard *et al.*, 2000 ; del Mar Lleó *et al.*, 2000 ; Grey and Steck, 2001b ; Nilsson *et al.*, 1991 ; Turner *et al.*, 2000 ; Bogosian *et al.*, 2000).

Les souches isolées lors de cette étude sont tous des *Campylobacter coli*, or la plupart des études antérieures ont montré un taux d'isolement plus élevé pour l'espèce *Campylobacter jejuni* (Eyles *et al.*, 2003) par rapport à l'isolement du *Campylobacter coli* ; un phénomène encore à élucider.

III – Contamination de l'eau

L'eau, au cours de son parcours dans le sol ou dans les rivières, se charge de différents polluants d'origine naturelle et/ou d'origine humaine. Un large éventail de causes participe à cette pollution. La contamination microbiologique des eaux est en relation avec les activités humaines domestiques, agricoles, d'élevages et industriels. Les sources potentielles de pollution organique sont les latrines, les dépôts d'ordures, les eaux usées domestiques, les dépôts de fumier, les étables, et encore tant d'autres. Il est donc normale que les eaux de surface, les eaux de puits non traitées connaissent une charge microbienne très élevée. Or, les eaux de boisson des zones rurales ne connaissent aucun traitement pour les rendre potables.

Les infections à *Campylobacter* notées dans la zone rurale de Moramanga peuvent être aussi causées par d'autres facteurs à part la consommation d'eau contaminée tel le contact direct avec les animaux réservoirs du germe qui pourrait favoriser l'exposition de l'homme, notamment les enfants en bas âge, à l'infection à *Campylobacter*. Effectivement, les infrastructures dans les zones rurales négligent une bonne hygiène pour prévenir les maladies diarrhéiques d'origine zoonotique. Le contact avec les déjections des animaux porteurs du germe favorise aussi l'exposition et la contamination.

IV – Qualité de l'eau en termes de charge microbienne

Les résultats du dénombrement des microorganismes revivifiants présents dans les échantillons d'eau montrent un chiffre très élevé pour une charge microbienne. Le bilan de ces analyses confirme la mauvaise qualité des eaux de consommation de la population de la zone de Moramanga. Ceci pourrait être en rapport avec l'inexistence d'infrastructures pour le traitement de l'eau afin de mettre à la disposition de la population une eau de bonne qualité. La présence de bactéries autres que *Campylobacter* issues de la culture sur CCDA montre qu'il existe un nombre considérable de bactéries antibiotiques-résistantes dans l'environnement et notamment dans les eaux. Le niveau élevé du dénombrement des microorganismes n'a pas de relation directe avec la présence des *Campylobacter* spp. dans les eaux du fait que la corrélation entre eux avoisine la valeur zéro ($R^2 = 0,01$)

La potabilité de l'eau consommée par la population figure parmi les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD) décrits par l'Organisation des Nations Unies (ONU). En projetant que d'ici 2015, la pauvreté serait réduite, un développement durable par l'accès à l'eau potable serait à portée de tous, l'assainissement et bien d'autres objectifs. L'accès à l'eau potable est un enjeu stratégique pour la diminution des cas de maladies épidémiologiques associées à la non potabilité de l'eau. D'autant plus que le droit à l'eau potable et à l'assainissement est un droit de l'homme essentiel (Assemblée Générale des Nations Unies, 2010). L'eau saine est vitale, notre santé et notre bien-être en dépendent. En outre, le ministère malgache a mis en place le code de l'eau qui vise à offrir une eau potable à sa population.

Les maladies diarrhéiques d'origine hydrique sont souvent reliées à la salubrité de l'eau consommée ainsi qu'à un manque d'hygiène. Louis Pasteur disait « Nous buvons 90 % de nos maladies ».

V – Analyse moléculaire

L'analyse moléculaire a eu pour but au départ d'établir un nouveau mode opératoire en effectuant une PCR à partir du bouillon d'enrichissement. Le principe étant de faire en parallèle une analyse moléculaire, pour les échantillons positifs, et une analyse microbiologique. Cette dernière servira de méthode de référence ; une comparaison devrait être entreprise pour pouvoir valider la méthode de PCR à partir du bouillon d'enrichissement. Malheureusement, les échantillons positifs ne sont qu'au nombre de trois, ce chiffre n'est pas valable statistiquement pour une comparaison et surtout pour une validation de méthode.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les objectifs essentiels de cette recherche étaient de confirmer la présence de *Campylobacter* afin d'en déduire le niveau de contamination des eaux de boissons et d'apprécier la qualité de l'eau consommée par la population de la zone rurale de Moramanga. L'étude a permis de mettre en évidence la présence du germe *Campylobacter* principalement dans les eaux de boisson, mais en très faible proportion. L'eau de boisson est souillée par la bactérie du genre *Campylobacter*, cela permet d'affirmer la circulation de ce germe dans le milieu ambiant. Par contre, l'environnement pourrait être beaucoup plus contaminé que l'on ne pense par l'intermédiaire de la contamination fécale des milieux. Des études pourraient être menées sur les autres facteurs environnementaux à part l'eau de boisson.

Cette étude contribuera à expliquer les manifestations diarrhéiques, dues à l'infection à *Campylobacter*, notées dans la zone rurale de Moramanga ; elle pourrait apporter quelques points essentiels pour l'étude sur « *l'exposition environnementale de la population infantile de 0 à 3 ans, à l'infection à Campylobacter* » menée par le Dr Rindra Vatosoa RANDREMANANA depuis 2008.

Pour ce qui est de la qualité de l'eau, les échantillons présentent une charge très élevée en matière de microorganismes revivifiables ; la qualité bactériologique des eaux de boissons est non conforme aux normes, du point de vu microbiologique. Pour la population de cette zone consommant une eau de mauvaise qualité, ce document pourrait être un outil de base pour appuyer un éventuel projet d'assainissement comme l'adduction d'eau potable. L'eau de boisson devrait être traitée, afin d'éliminer les polluants nocifs ou non, pathogènes ou non ; avant sa distribution à la population.

Une étude plus approfondie sur la méthode moléculaire serait intéressante pour déceler la présence du germe même en état VBNC. Dans ce cas, l'état viable de la bactérie n'est plus nécessaire car il suffit que d'une infime quantité de matériel génétique pour détecter sa présence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AFNOR**, 1996. EN ISO 10272, Association Française de Normalisation, Paris, pp 11-14.
- **AFNOR**. *Microbiologie alimentaire*, 8^{ème} édition, 2002. Méthodes horizontales de références. Saint-Denis La Plaine : AFNOR ; Tome 1 : 353-373.
- **Assemblée Générale des Nations Unies A/RES/64/292**, 3 août 2010. Le droit de l'homme à l'eau et à l'assainissement, 64^{ème} session point 48 de l'ordre du jour, 3pp.
- **Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E., & Donelli, G.**, 2006. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 83-91.
- **Batzing, L. B.**, 2002. The Bacteria. In *Microbiology: an introduction*. United States of America : Thomson Learning, pp 261-282
- **Barer, M.R. & Harwood, C.R.**, 1999. Bacterial viability and culturability. In *Advances in Microbial Physiology*, 41: 93–137.
- **Besnard, V., Federighi, M. & Cappelier, J.M.**, 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31 : 77–81.
- **Beumer, R., De Vries, J. & Rombouts, F.M.**, 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of food Microbiology*, 15, 153-163.
- **Blackburn, C.W. & McCarthy, J.D.**, 2000. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *International Journal of food Microbiology*, 55 : 285–290.
- **Bogard, M., Lamoril, J., & Ameziane, N.**, 2005. *Principe de biologie moléculaire en biologie clinique*. Elsevier, chap : 11 pp : 325-326.
- **Bogosian, G., Aardema, N.D., Borneuf, E.V., Morris, P.J.L. & O'Neil, J.P.**, 2000. Recovery of hydrogen peroxide sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *Journal of Bacteriology*. 182: 5070–5075.
- **Bolton, F.J., Coates, D., Hutchinson, D.N., & Godfree, A.F.**, 1987. Study of thermophilic *Campylobacter* in a river system. *Journal Applied of Microbiolgy*, 62: 167–176.
- **Brown, P.E. Christensen, O. F. Clough, H. E., Diggle, P.J., Hart, C.A., Hazel, S., Leatherbarrow, A.J.H., Moore, A., Sutherst, J., Turner, J., Williams, N.J.**,

- Wright, E.J., & French N.P.**, 2004. Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 70.11: 6501-6511.
- **Calverton, & Maryland**, 2005. Enquête Démographique et de Santé Madagascar 2003-2004. INSTAT Madagascar et ORC Macro, 301pp.
 - **Carter, A.M., Pacha, R.E., Clark, G.W. & Williams, E.A.**, 1987. Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. In surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 523–526.
 - **Cassel-Beraud, A.M., Song, P., Rakotoarimanana, D.R., Razanamparany, M., & Candito, D.**, 1992. Campylobacters thermophiles et autres agents entéropathogènes au cours des diarrhées infantiles. Bilan microbiologique sur deux années en milieu hospitalier à Tananarive (Madagascar). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 22: 848-854.
 - **Chaperon, P., Danloux, J., & Ferry, L.**, 1993. *Fleuves et rivières de Madagascar*. Monographies hydrologiques ORSTOM, Paris, 874p.
 - **Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O. & Obi, C.L.**, 2002. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 237-244.
 - **Colin, M.**, 2006. Fiche de description de danger transmissible par les aliments par *Campylobacter* spp. Agence Française de surveillance sanitaire, 3pp.
 - **Del Mar Lleó, M., Pierobon, S., Tafi, M.C., Signoretto, C. & Canepari, P.**, 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 : 4564–4567.
 - **Denis, M., Tanguy, M.B., Chidaine Laisney, M.J., Mégraud, F., & Fravallo, P.**, 2011. Description and sources of contamination by *Campylobacter* spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France in *Pathologie Biologie*, Elsevier, 59: 256–263.
 - **Devane, M.L., Nicol, C., Ball, A., Clena, J.D., Scholes, P., Hudson, J.A., Baker, M.G., Gilpin, B.J., Garrett, N. & Savill, M.G.**, 2005. The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes, *Journal of Applied Microbiology*, 98: 980-998.
 - **EFSA**. 2004. The European Food Safety Authority Journal (2004) 177 1-10

- **Eyles, R., Niyogi, D., Townsend, C., Benwell, G. & Weinstein, P.,** 2003. Spatial and temporal patterns of *Campylobacter* contamination underlying public health risk in the Taieri river, New Zealand. *Journal Environmental Quality*, 32: 1820–1828.
- **Garrity, G.M., Bell, J.A., & Lilburn, T.G.,** 2004. Taxonomic Outlines of Prokaryotes Release, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Editorial office of Bergey's Manual Trust, New York.
- **Georges-Courbot, M.C., Cassel-Beraud, A.M., Gouandjika, I., Monges, J. & Georges, A.J.,** 1990. A cohort study of enteric *Campylobacter* infection in children from birth to two years in Bangui (Central African Republic). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 122–125.
- **Gupta, R.S.,** 2006. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacterales). *BioMedCentral Public Health*, 7 : 167-184.
- **Grey, B.E. & Steck, T.R.,** 2001. The viable but non-culturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 : 3866–3872.
- **Hartemann, P.,** 2001. Approvisionnement en eau et assainissement en milieu tropical. *Medecine Tropicale*, 61 : 210-213.
- **Harvey, P. & Leach S.,** 1998. Analysis of coccal cell formation by *Campylobacter jejuni* using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress, *Journal of Applied Microbiology*, 85: 398-404.
- **Hopkins, R.S., Olmsted, R. & Istre, G.R.,** 1984. Endemic *Campylobacter jejuni* infection in Colorado: identified risk factors. *American Journal of Public Health*, 74: 249–250.
- **Ikram, R., Chambers, S., Mitchell, P., Brieseman, M.A. & Ikam, O.H.,** 1994. A case control study to determine risk factors for *Campylobacter* infection in Christchurch in the summer of 1992–3. *New Zealand Medical Journal*, 107: 430–432.
- **Jones, D. M., Sutcliffe, E. M. & Curry, A.,** 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*,. *Journal of Medical Microbiology*, 137: 2477-2482
- **Jones, K.,** 2001. *Campylobacter* in water, sewage and environment. *Journal of Applied Microbiology*, 90 : 68-79.
- **Jones, K., Anderson, S. & Obiri-Danso, K.,** 1999. Use of *Campylobacter* and faecal coliforms to trace sources of pollution on a reservoir. Abstract 29. *Society of Applied Microbiology Conference on 33 Aquatic Microbiology*, York, July.

- **Jones, K. & Hobbs, A.,** 1996. *Campylobacter* and faecal indicators in streams and a small river subject to farm run-off. In: *Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms* (Ed. by Newell, D.G., Ketley, J.M. and Feldman, R.A) New York: Plenum Press. pp. 123-128.
- **Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R. & Barer, M.R.,** 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 73 : 169–187.
- **Labenne, M., Roos, P., Feldmann, M., Merlin, J.P., Schaack, F., & Leveau, P.,** 1991. Place des *Campylobacter* dans les diarrhées infectieuses chez les enfants. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 21 : 616-619.
- **Monjour, L., & Helmer, R.,** 1997. Les pathologies d'origine hydriques et la potabilité de l'eau, les cahiers du Mouvement Universel de la Responsabilité Scientifique n°33, pp : 11-26.
- **Mornet, E.,** Méthode d'analyse de l'ADN, applications médicales et médico-légales [<http://www.sesep.uvsq.fr/formation/methodes.html#sommaire>] online consultée le 24-11-2011.
- **Nilsson, L., Oliver, J.D. & Kjelleberg, S.,** 1991. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Journal of Bacteriology*, 173 : 5054–5059.
- **OMS.** 1998. Directives de qualité pour l'eau de boisson. Organisation Mondiale de la Santé, 40 p.
- **Oosterom, J., Den Uyl, C.H., Bänffer, J.R.J. & Huisman, J.,** 1984. Epidemiological investigations on *Campylobacter jejuni* in households with primary infection. *Journal of Hygiene* (London), 92: 325–332.
- **Pacanowski, J., Lalande, V., & Meynard, J.L,** 2010. Bactériémie à *Campylobacter* : épidémiologie, manifestations cliniques, traitement et facteurs pronostiques. *La lettre de l'infectiologue*, 25 : 20-25.
- **Pérez-Boto, D., Francisco, J., Garcí'a-Pena, Juan C., & Abad-Moreno,** 2010. Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grand-parent heavy breeders in *Avian Pathology*, 39: 483-487.
- **Poitras, E. & Houde, A.,** 2002. La PCR en temps réel : principes et applications. Reviews in *Biology and Biotechnology*, 2 : 2-11.
- **Prescott, L., Harley, J. & Klein, D.,** 1999. Microbial growth. In *Microbiology 4th ed.* North America : McGraw-Hill companies, pp.113-134.

- **Prescott, L., Harley, J. & Klein, D.,** 1999. Microbial Taxonomy. *In Microbiology 4th ed.* North America : McGraw-Hill companies, pp.393-420.
- **Prescott, L., Harley, J. & Klein, D.,** 1999. Bacteria the proteobacteria. *In Microbiology 4th ed.* North America : McGraw-Hill companies, pp.458-487.
- **Prescott, L., Harley, J. & Klein, D.,** 1999. The epidemiology of infectious Disease. *In Microbiology 4th ed.* North America : McGraw-Hill companies, pp.720-737
- **Prescott, L., Harley, J. & Klein, D.,** 1999. Human Disease caused primarily by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *In Microbiology 4th ed.* North America : McGraw-Hill companies, pp.766-798.
- **Rakotoniaina, H.H.,** 2005. Maîtrise des techniques d'analyses microbiologiques sur les produits charcutiers dans le cadre d'autocontrôle d'une société. [Rapport de stage technicien] Antananarivo : Institut Supérieur Protestant Paul Minault, 55p.
- **Rollins, D.M. & Colwell, R.R.,** 1986. Viable but non culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 531–538.
- **Savill, M.G., Hudson, J.A., Ball, A., Klena, J.D., Scholes, P., McCormick, R.E., & Jankovic, D.,** 2001. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 36-46.
- **Steinhauserova, I., Ceskova, J., Fojtikova, K., & Obrovoska, I.,** 2001. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 470–475.
- **Skirrow, M. B.,** 1977. Campylobacter enteritis: a “new” disease. *British Medical Journal*, 2 : 9-11.
- **Tai-lee, H. & Pao-chi, K.,** 2009. Isolation of *Campylobacter* spp. in surface waters of Taiwan. *Journal of Applied Microbiology*, 44: 15-20.
- **Tauxe, R.V.,** 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *In: Campylobacter jejuni: current state and future trends*, Nachamkin I., Blaser M.J., & Tompkins L.S., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 9–19.
- **Teschke, Neil Bellack, Hui Shen, Atwater, J., Chy, R., Koehoorn, M., MacNab, Y.C., Schreier, H., & Isaac-Renton, J.L.,** 2010. Water and sewage systems, socio-demographics, and duration of residence associated with endemic intestinal infectious diseases: A cohort study, *BioMedCentral Public Health*, 10: 767.

- **Turner, K., Porter, J., Pickup, R. & Edwards, C.,** 2000. Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of *Salmonella typhimurium* measured by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 89 : 90–99.
- **Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J.,** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy in Emendation of generic descriptions and proposal of *Acrobacter*, *International journal of systematic bacteriology*, 41: 88-103.
- **Vereen, E., Lowrance, R.R., Cole, D.J. & Lipp, E.K.,** 2007. Distribution and ecology of *Campylobacter* in coastal plain streams (Georgia, United States of America), *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1395-1403.
- **Vicens, R.J., & Coulanges, P.,** 1982.les eaux de consommation à Madagascar : surveillance bactériologique de l'eau traitée de 1957 à 1981. *Archives de l'Institut Pasteur*, 49 : 133-149.
- **Wegmüller, B., Lüthy, J., & Candrian, U.,** 1993. Direct polymerase chain reaction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Applied of Environmental Microbiology*, 59: 2161–2165.
- **WHO [World Health Organization]** 2001. The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and proceedings of a WHO consultation of experts, Copenhagen, Denmark, 21–25 November 2000.

GLOSSAIRE

Amplicon : un fragment d'ADN amplifié pendant une réaction de PCR.

Asymptomatique: se dit d'une maladie qui ne se manifeste pas par des symptômes. Se dit d'une personne susceptible de transmettre une maladie alors qu'elle n'en présente pas les signes cliniques.

Bactériémie : désigne la présence de bactéries pathogène dans le sang. La bactériémie n'est pas forcément responsable de signes cliniques, surtout lorsque ce passage est transitoire

Cohorte : Ensemble des individus ou des couples considérés ensemble sur le plan démographique

Entérite : est une inflammation intestinale suite à une infection qui touche les muqueuses présentes dans l'estomac et l'intestin. Elle est due dans la très grande majorité des cas à un virus ou à des bactéries.

Epidémie : propagation rapide d'une maladie infectieuse à un grand nombre de personnes, le plus souvent par contagion.

Epidémiologie : une discipline qui fait une étude scientifique des épidémies; qui a rapport aux études des relations entre les maladies et divers facteurs intervenant dans leur apparition et leur développement.

Epidémiologique : qui se rapporte à l'épidémiologie.

Microaérophile : organisme dont la croissance est optimale dans un milieu où la concentration en oxygène moléculaire (O₂) est inférieure à la concentration atmosphérique.

Morbidité : nombre de personnes souffrant d'une maladie donnée pendant un temps donné, en général une année, dans une population.

Organolectique : se dit des substances (en particulier absorbées par voie buccale) capables d'impressionner un récepteur sensoriel (organe de sens).

Prévalence : nombre de personnes atteintes d'une certaine maladie à un moment donné dans une population donnée.

Revivifiable : organisme capable de se développer et de se multiplier dans un milieu de culture

Sporadique : qualifie ce qui touche seulement quelques individus au sein d'une population, cas par cas, sans qu'il se forme une chaîne de transmission continue

Symptomatique : Relatif aux symptômes d'une affection. Phénomènes provoqués par une maladie, permettant d'établir le diagnostic de celle-ci

Thermotolérant : capacité de tolérer une température élevée.

Zoonotique : maladie qui peut se transmettre de l'animal à l'homme.

ANNEXES:

**ANNEXE I : DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES REVIVIFIABLES à 36°
C et à 22° C POUR DES DILUTIONS au 100^{ème}**

Tableau A :(Réf écht : référence échantillon, MA : Microorganisme revivable en aérobie)

catégorie d'eau	réf écht	MA 36°C	MA 22°C
eau de puits	2375	39	45
eau de puits	2376	55	64
eau de rivière	2377	49	51
eau de rivière	2378	53	77
eau de puits	2445	18	17
eau de puits	2446	16	24
eau de puits	2447	8	22
eau de rivière	2448	49	55
eau de puits	2449	2	2
mare	2464	52	54
rizière	2465	41	61
eau de puits	2466	32	47
eau de puits	2467	45	49
eau de puits	2471	39	52
eau de puits	2500	18	31
eau de rizière	2501	29	32
eau de puits	2502	22	29
eau de rizière	2503	13	11
eau de puits	2504	9	11
eau de rivière	2526	20	31
eau de rivière	2527	14	25
eau de rizière	2528	21	29
eau de puits	2529	17	28
eau de puits	2530	23	34
eau de puits	2593	9	9
eau de puits	2594	10	17
eau de puits	2595	236	382
eau de puits	2596	51	69
eau de puits	2597	7	9

eau de puits	2618	51	45
eau de puits	2619	42	49
eau de puits	2620	32	41
eau de puits	2621	41	48
eau de puits	2622	24	33
eau de puits	2664	206	402
eau de puits	2665	41	63
eau de puits	2666	9	11
eau de rivière	2667	57	59
eau de rizière	2668	6	15
eau de puits	3347	143	219
eau de stock de ménage	2762	49	57
eau de stock de ménage	2763	1	1
eau de stock de ménage	2764	146	181
eau de stock de ménage	2765	101	133
eau de stock de ménage	2766	227	239
eau de stock de ménage	2781	102	197
eau de stock de ménage	2782	89	101
eau de stock de ménage	2783	67	71
eau de stock de ménage	2784	81	89
eau de stock de ménage	2785	94	99
eau de stock de ménage	2820	491	108
eau de stock de ménage	2821	591	690
eau de stock de ménage	2822	854	868
eau de stock de ménage	2823	301	354
eau de stock de ménage	2824	98	169
eau de stock de ménage	2852	94	125
eau de stock de ménage	2853	162	154
eau de stock de ménage	2854	201	237
eau de stock de ménage	2855	175	186
eau de stock de ménage	2856	93	103
eau de stock de ménage	2901	16	32
eau de stock de ménage	2902	27	31

eau de stock de ménage	2903	675	702
eau de stock de ménage	2904	29	37
eau de stock de ménage	2905	46	61
eau de stock de ménage	2918	29	37
eau de stock de ménage	2919	54	66
eau de stock de ménage	2920	46	54
eau de stock de ménage	2921	39	44
eau de stock de ménage	3015	64	82
eau de stock de ménage	3016	448	492
eau de stock de ménage	3017	102	183
eau de stock de ménage	3018	86	155
eau de stock de ménage	3019	46	66
eau de stock de ménage	3020	237	189
eau de stock de ménage	3033	43	49
eau de stock de ménage	3034	27	32
eau de stock de ménage	3035	98	87
eau de stock de ménage	3036	149	161
eau de stock de ménage	3037	278	257
eau de stock de ménage	3072	102	210
eau de stock de ménage	3073	872	981
eau de stock de ménage	3074	228	339
eau de stock de ménage	3075	210	257
eau de stock de ménage	3076	489	829
eau de stock de ménage	3092	241	307
eau de stock de ménage	3093	274	297
eau de stock de ménage	3094	302	329
eau de stock de ménage	3095	247	259
eau de stock de ménage	3096	162	176
eau de stock de ménage	3157	141	175
eau de stock de ménage	3158	561	616
eau de stock de ménage	3159	322	256
eau de stock de ménage	3160	292	349
eau de stock de ménage	3161	64	78

eau de stock de ménage	3182	57	65
eau de stock de ménage	3183	91	118
eau de stock de ménage	3184	167	154
eau de stock de ménage	3185	268	289
eau de stock de ménage	3186	411	399
eau de stock de ménage	3225	501	607
eau de stock de ménage	3226	347	378
eau de stock de ménage	3227	198	207
eau de stock de ménage	3228	206	297
eau de stock de ménage	3229	301	375
eau de stock de ménage	3282	524	816
eau de stock de ménage	3283	930	1297
eau de stock de ménage	3284	482	536
eau de stock de ménage	3285	688	756
eau de stock de ménage	3286	789	1502
eau de stock de ménage	3300	176	205
eau de stock de ménage	3301	207	309
eau de stock de ménage	3302	306	348
eau de stock de ménage	3303	407	468
eau de stock de ménage	3304	197	209
eau de stock de ménage	3344	256	274
eau de stock de ménage	3345	304	393
eau de stock de ménage	3346	207	299

ANNEXE II : MILIEUX DE CULTURES (Source *Microbiologie alimentaire*, 8^{ème} édition)**Composition et préparation des milieux de culture**

1 – Bouillon Preston :

Composition du milieu de base : 10.0 g d'extrait de viande, 10.0 g de Peptone, 5.0 g de Chlorure de sodium, 1.0 g d'Agar-agar, 1000 ml d'eau.

Préparation : Dissoudre les composants de base complet dans l'eau, en chauffant jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,5 \pm 0,2$ à 25° C. Répartir le milieu de base dans des flacons de capacités appropriées et les stériliser à l'autoclave réglé à 121° C pendant 15 minutes.

2 – Gélose à la cefopérazone, au charbon et au désoxycholate (CCDA) :

Composition du milieu de base : 10.0 g d'extrait de viande, 10.0 g de Peptone, 5.0 g de Chlorure de sodium, 4.0 g de charbon, 3.0 g d'hydrolysate de caséine, 1.0 g de désoxycholate de sodium, 0.25 g de sulfate de fer(II), 0.25 g de pyruvate de sodium, 8.0 g à 18.0 g d'Agar-agar selon son pouvoir gélifiant, 1000 ml d'eau.

Préparation : Dissoudre les composants de base dans l'eau en portant à l'ébullition. Ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$ à 25° C après la stérilisation.

Solution de céfopérazone : 0.064 g de céfopérazone que l'on dissout dans 20 ml d'eau.

Préparation du milieu complet :

Ajouter stérilement à 990 ml du milieu de base, fondu puis refroidi à environ 47° C, 10 ml de solution de céfopérazone et mélanger. Verser environ 15 ml du milieu complet dans des boîtes de pétri stériles et laisser solidifier. Stériliser à l'autoclave réglé à 121° C pendant 15 minutes.

3 – Gélose au citrate de fer et au trois sucre (gélose TSI) :

Composition : 3.0 g d'extrait de viande, 3.0 g d'extrait de levure, 20.0 g de Peptone, 5.0 g de chlorure de sodium, 10.0 g de lactose, 10.0 g de saccharose, 1.0 g de glucose, 0.3 g de citrate de fer(III), 0.3 g de thiosulfate de sodium, 0.024 g de rouge de phénol, 0.8 à 18.0 g d'Agar-agar selon son pouvoir gélifiant, 1000 ml d'eau.

Préparation : Dissoudre les composants de base dans l'eau, en portant à l'ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25° C. Répartir le milieu, par quantité de 10 ml dans des tubes et stériliser à l'autoclave réglé à 121° C pendant 15

minutes. Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2,5 cm de profondeur.

4 – Bouillon Brucella :

Composition : 10.0 g de Tryptone, 10.0 g de Peptone peptique de viande, 1.0 g de glucose, 2.0 g d'extrait de levure, 5.0 g de Chlorure de sodium, 0.1 g d'Hydrogénosulfite de sodium, 100 ml d'eau.

Préparation : Dissoudre les composants de base dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25°C . Répartir le milieu par quantité souhaitée dans des tubes appropriés. Stériliser à l'autoclave réglé à 121°C pendant 15 minutes.

5 – Skim-milk

Composition moyenne

Humidité : 5,0%

Cendres : 8,0%

Azote total : 5,3%

Sucres réducteurs (ex : lactose monohydraté) : 48,0%

Extrait éthéré soluble : 0,25%

Mélanger la poudre avec une petite quantité d'eau distillée de façon à obtenir une pâte lisse, puis ajouter peu à peu de l'eau distillée pour obtenir un mélange à 10 %. Ceci équivaut à du lait frais, et peut être stérilisé 5 minutes à 121°C à l'autoclave. Prendre soin de ne pas surchauffer pendant la stérilisation pour ne pas caraméliser la solution. Ce produit peut être utilisé seul ou avec d'autres ingrédients dans des milieux de culture plus complexes. Une solution à 10 % de lait écrémé en poudre additionnée de 0,001 % de pourpre de bromocrésol constitue un milieu très satisfaisant pour cultiver les germes des produits laitiers ou pour différencier les espèces de *Clostridium*, etc. Les milieux contenant du lait écrémé en poudre conviennent tout particulièrement aux tests d'orientation tels que la fermentation du lactose et la digestion ou la coagulation de la caséine. Ce produit n'est pas toujours exempt de résidus antimicrobiens ; il faut donc effectuer des tests de conformité lorsqu'il est spécifié dans une formule d'utiliser un lait en poudre sans antibiotique.

ANNEXE III : FICHE D'IDENTIFICATION DES GERMES « *Campylobacter* » THERMOTOLERANTS

Tableau B : Fiche d'identification

Date : _____ Visa : _____
 Référence du lot/échantillon : _____
 Isolement direct : ☐ Isolement après enrichissement : ☐

TESTS DE CONFIRMATION

Référence échantillons	colonie	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5
Etat frais	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Oxydase N°lot disques :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Catalase N° lot eau oxygénée :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Culture en gélose TSI N°lot gélose :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Croissance à 25°C N° lot bouillon Brucella :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Sensibilité à l'acide nalidixique N°lot ATB : N°lot MH + sang :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Sensibilité à la céfalotine N°lot ATB :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Hydrolyse de l'hypurate N°lot réactifs :	1					
	2					
	3					
	4					
	5					

+ : test positif

- : test négatif

S : sensible

R : résistant

CONCLUSION :Présence de *Campylobacter* thermotolérants ☐Absence de *Campylobacter* thermotolérants ☐

Tableau C : exemple de fiche d'identification complétée

Date 16 août 2011 Visa : 17
 Référence du lot/échantillon 2374 au 2378
 Isolement direct : ☐ Isolement après enrichissement ☒

TESTS DE CONFIRMATION

Référence échantillons	colonie	2374	2375	2376	2377	2378
Etat frais	1	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
	2	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
	3	Immobile	Immobile	Mobile	Immobile	Immobile
	4	Mobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
	5	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
Oxydase N°lot disques :	1					
	2	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-
	4	+	+	+	-	-
	5	+	-	-	-	-
Catalase N° lot eau oxygénée :	1					
	2	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+
	4	+	-	+	-	+
	5	+	-	-	-	-
Culture en gélose TSI N°lot gélose :	1	+		-		
	2	-		-		
	3	-		-		
	4	-		-		
	5	-		-		
Croissance à 25°C N° lot bouillon Brucella :	1					
	2					
	3			-		
	4	-				
	5					
Sensibilité à l'acide nalidixique N°lot ATB : N°lot MH + sang :	1					
	2					
	3			S		
	4	S				
	5					
Sensibilité à la céfalotine N°lot ATB :	1					
	2					
	3			R		
	4	R				
	5					
Hydrolyse de l'hyppurate N°lot réactifs :	1					
	2					
	3			-		
	4	-				
	5					

+ : test positif - : test négatif S : sensible R : résistant

CONCLUSION :Présence de *Campylobacter thermotolérants* ☒Absence de *Campylobacter thermotolérants* ☐Présence de *Campylobacter coli* dans les échantillons 2374 et 2376

ANNEXE IV : RESUME DU PROJET MADES

Résumé du projet Mades entrepris par le Dr Rindra Vatosoa RANDREMANANA

La Campylobactériose zoonose et maladie d'origine alimentaire, constitue la 1^{ère} cause bactérienne de diarrhées dans les pays développés.

La multiplication de *Campylobacter* spp. se fait principalement chez les mammifères et les oiseaux. Les principaux réservoirs sont les animaux sauvages, domestiques, d'élevage (volailles, bovins,...) et l'homme. L'environnement, comme l'eau et le sol, peut être contaminé par les déjections de ces animaux. La transmission à l'homme peut se faire alors soit par ingestion d'aliments contaminés, soit par contact direct avec les animaux infectés. Les eaux de surface utilisées comme eau de boisson ou à des fins récréatives ont été rapportées comme source potentielle de contamination humaine. Dans les pays en développement, les infections/diarrhées à *Campylobacter* sont dues à un manque d'hygiène, la proximité avec les animaux facilite l'acquisition du germe.

L'analyse préliminaire des données de l'étude sur les infections/diarrhées à *Campylobacter* en milieu rural dans la commune d'Ambohibary, Moramanga a montré l'importance des portages asymptomatiques ; le rôle du réservoir animal et de l'hygiène dans la survenue d'une infection à *Campylobacter* comme la possession d'animaux d'élevage, l'existence de fientes de volailles sur le sol de la maison et de volailles attachés dans la maison. Ceci pourrait supposer une éventuelle circulation du germe dans la population animale (avicole, bovine,...) donc probablement dans l'environnement de ces 2 Fokontany. Pour vérifier cette hypothèse et afin de pouvoir estimer l'exposition de la population infantile des 2 Fokontany aux *Campylobacter* spp., une étude des sources de contamination comme l'eau de boisson sera menée.

L'étude durera 1 année avec des enquêtes biannuelles : en saison sèche (Mai à Août) et en saison humide (Novembre à Mars). Des analyses de prélèvements des points d'eaux communautaires et des stocks d'eaux des ménages seront menées avec des recueils d'informations sur les pratiques des stockages d'eaux de boisson des ménages. L'analyse des échantillons des stocks d'eaux sera systématique dans les ménages des enfants diarrhéiques excréteurs de *Campylobacter* spp. En plus, 30 prélèvements d'eaux seront analysés dans les ménages des enfants porteurs asymptomatiques de *Campylobacter* spp. et

30 dans ceux n'ayant jamais été porteurs à raison de 3 par hameau. La quantité d'eau à prélever sera de 1l que ce soit pour les points d'eaux ou les stocks d'eau dans les ménages.

Identification des partenaires

Les participants à cette étude sont tous de l'Institut Pasteur de Madagascar

Noms	Fonction	Coordonnées
Randremanana Rindra Vatosoa	Médecin épidémiologiste- Unité Epidémiologie	rrandrem@pasteur.mg
Ravaonindrina Noro	Médecin – Adjointe du LHAE	nravaoni@pasteur.mg

ANNEXE V : PHOTOS DE QUELQUES MATERIELS UTILISES AU LABORATOIRE
(prises par Andrianaivoravelona, D., & Onihary, A.M., 2011)



Hotte à flux laminaire



Etuves d'incubation



Boîtes CCDA dans une jarre



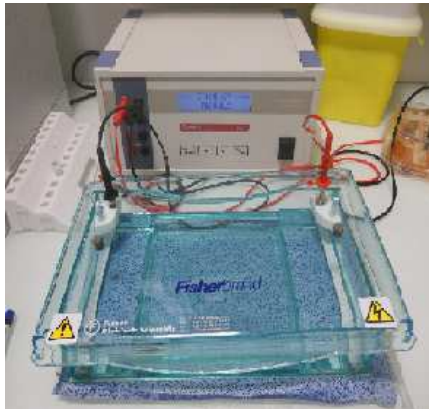
Bouillon Preston dans une jarre



Echantillons d'eau



Rampes de filtration



Electrophorèse sur gel



Biometra Thermocycleur 3000



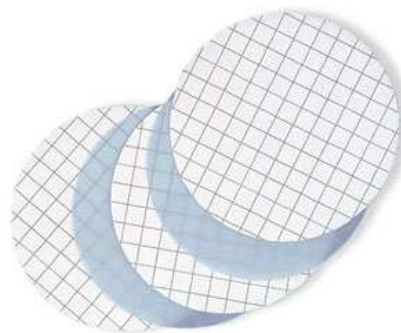
Oxydase positive



Catalase positive



Plaque eutectique



Membrane filtrante

Titre : Etude de la contamination des sources d'eau de boisson par *Campylobacter* spp. en milieu rural, région Alaotra-Mangoro, district de Moramanga, commune d'Ambohibary

Résumé

Une manifestation diarrhéique causée par le germe *Campylobacter* à Moramanga (région Alaotra-Mangoro), relevée par l'Unité Epidémiologique de l'Institut Pasteur de Madagascar, conduit à effectuer une recherche pouvant expliquer l'origine de cette infection. L'étude s'est focalisée principalement sur les facteurs environnementaux susceptibles d'engendrer la prolifération de cette bactérie. Une analyse de la présence ou absence de ce microorganisme dans les eaux de boissons, pour une période allant du mois d'août au mois de novembre 2011, a permis de dresser un profil du niveau de contamination de l'environnement. Les résultats ont montré un faible taux d'isolement du germe (2,54 %), confirmant son existence dans le milieu ambiant, sans pour autant affirmer que l'eau de boisson est la principale source de la diarrhée observée dans la zone précitée. Les tests statistiques ont fait ressortir une dépendance entre les différentes catégories d'eau et la présence de la bactérie. Par contre, aucune relation n'est notée entre cette dernière et la charge microbienne. Pour mieux expliquer la prévalence à *Campylobacter*, d'autres facteurs environnementaux, à part l'eau de boisson, devraient faire l'objet de recherches ultérieures.

Mots clés : *Campylobacter*, contamination, facteurs environnementaux, eaux de boisson, Moramanga, Madagascar

Abstract

A manifestation of diarrhea caused by *Campylobacter* germs in the area of Moramanga (region Alaotra-Mangoro), noted by the Epidemiological Unit of the 'Institut Pasteur de Madagascar', leads to a study that attempts to explain the origin of this infection. The study focused mainly on environmental factors that could contribute to the proliferation of this pathogen. An analysis of the presence or absence of this bacterium in drinking waters would provide a profile of the level of contamination of the environment, for a period of August to November 2011. The results showed a low rate of isolation of the organism (2, 54%), which can confirm its existence in the environment, without say that drinking water is the main cause of *Campylobacter* found in the area. Statistical tests revealed a dependency between the different categories of water and the presence of the bacteria. On the other side, no relationship was found between the latter and the microbial load. An attempt to better explain *Campylobacter* prevalence, other factors besides drinking water could be the topic of further study.

Keywords: *Campylobacter*, contamination, environmental factors, drinking water, Moramanga, Madagascar.

L'encadreur

Professeur Noromalala
RASOAMAMPIONONA RAMINOSOA

L'impétrante

Dina ANDRIANAIVORAVELONA
Lot II A 28 Antaninandro Antananarivo 101
(+261)34 08 129 26 / (+261)33 03 066 53
dinatia8@gmail.com