DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIE

MENTION : BIOLOGIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES DE LA VIE

PARCOURS : BIOTECHNOLOGIES

ETUDE DE LA QUALITE HYGIENIQUE ET BACTERIOLOGIQUE D'UN ALIMENT DE RUE CONSOMME DANS LA VILLE D'ANTANANARIVO : CAS DES HUITRES « *Ostrea margaritacea* »

Présenté par : **ANDRIANTELOMANANA Hoby Nalisoa**

Maitre ès Sciences

Soutenu le 09 novembre 2015 devant la commission d'examen composée de :

Président du jury : Pr RAZANAMPARANY Louisette

Rapporteur : Pr ANDRIANARISOA Blandine

Examinateurs : Dr RANDRIANIERENANA Ando Lalaniaina

Dr TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina

Année universitaire : 2014-2015

Je dédie ce mémoire à :

A DIEU tout puissant qui a éclairé mon chemin tout au long de mes études.

A mon père et ma mère, en témoignage de leur affection. Qu'ils trouvent en cet ouvrage le fruit de tant d'années de sacrifices et de dévouements. Que ma réussite soit le couronnement de leurs efforts.

A mes sœurs, pour qu'elles sachent qu'à cœur vaillant rien n'est impossible. Je leur souhaite succès et réussite dans tout ce qu'elles entreprennent.

A toute ma famille

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de diverses personnes à qui je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude, plus particulièrement à :

- Madame le Professeur **ANDRIANARISOA Blandine**, Professeur titulaire et responsable de l'Equipe d'Accueil Doctorale(EAD) en Biotechnologies de l'Université d'Antananarivo, qui a bien voulu accepter et assurer notre encadrement avec dévouement et patience et qui n'a ménagé ni son temps ni ses conseils durant la réalisation de ce mémoire. Nous avons apprécié votre confiance, votre disponibilité et votre sympathie qui nous ont permis d'avancer et de mener à terme ce travail.
- Madame le Professeur **RAZANAMPARANY Louisette**, Professeur titulaire à l'Université d'Antananarivo, qui malgré ses multiples occupations et responsabilités a bien voulu nous accorder son attention et sa précieuse assistance et nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire.
- Madame le Docteur **RANDRIANIERENANA Ando Lalaniaina**, chef de département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, et Monsieur le Docteur **TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina**, Maître de conférence à l'Université d'Antananarivo, pour les intérêts que vous portez à ce travail et l'honneur que vous me faites d'avoir accepté la tâche de juger ce travail malgré vos nombreuses obligations, veuillez accepter ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes respects le plus sincères.

J'exprime aussi ma profonde gratitude envers :

- Monsieur le Professeur **RAHERIMANDIMBY Marson**, Doyen de la Faculté des Sciences à l'Université d'Antananarivo, de nous avoir donné la permission de présenter ce mémoire au sein de son institution.
- Madame le Professeur **RALAMBORANTO Laurence**, Recteur de l'Université ASJA et Monsieur le Docteur **TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina**, Chef des unités de laboratoire de l'ASJA (Athénée Saint Joseph Antsirabe), de nous avoir accueillis à bras ouvert dans son laboratoire de recherche afin de réaliser notre travail.
- Tous les enseignants, personnel administratif et technique de la Faculté des Sciences de l'université d'Antananarivo, en particulier les enseignants-chercheurs du département de Biochimie Fondamentale et Appliquée.

Je tiens à remercier mes amis particulièrement mon promotion et toutes personnes physiques ou morales qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement ma famille particulièrement mes parents qui n'ont jamais cessé de déployer leurs efforts pour nous donner une bonne éducation et nous permettre d'accéder aux études grâce à leur appui moral et financier.

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION…….....1

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES……..2

I. GENERALITES SUR LES HUITRES……...2

I.1 Description…….2

I.2 Classification……..3

II. VALEURS NUTRITIONNELLES ET THERAPEUTIQUES

II.1 Valeurs nutritionnelles……..3

II.1.1 Les macroéléments……3

II.1.2 Les minéraux et vitamines…….4

II.1.2.1 Les sels minéraux……4

II.1.2.1 Les vitamines……..5

II.2 Valeurs thérapeutiques…….5

III. PRESENTATION DES DIVERS GERMES CONTAMINANT LES ALIMENTS……....6

III.1 Flore aérobie mésophile totale……....6

III.2 Coliformes totaux……....6

III.3 Coliformes fécaux……...6

III.4 *Escherichia coli*……...7

III.5 *St aphylococcus aureus*……...7

III.6 *Vibrio spp*……....8

III.7 *Salmonella sp*……..8

IV. QUALITE ET HYGIENE……...9

IV.1 QUALITE DES ALIMENTS……9

IV.1.1 Définition……9

IV.1.2 Composantes de la qualité……...9

IV.1.3 Différentes types de la qualité……9

IV.1.3.1 La qualité nutritionnelle……...9

IV.1.3.2 La qualité hygiénique……..10

IV.1.3.3 La qualité organoleptique……10

IV.1.3.3 La qualité marchande……..10

IV.2 HYGIENE DES ALIMENTS…….....11

IV.2.1 Définition……...11

IV.2.2 Importance de l'hygiène des aliments……....11

IV.2.3 La sécurité des aliments……11

IV.2.4 La salubrité des aliments……....11

MATERIELS ET METHODES

I. LES MATERIELS UTILISES……....12

I.1 Produits analysés……..12

I.2 Matériels de prélèvement……12

I.3 Matériels et équipement de laboratoire……....12

II. ECHANTILLONNAGE……....12

III. ENQUETE AUPRES DES VENDEURS ET GROSSISTES DES HUITRES

IV. METHODES DE PRELEVEMENT……....13

IV.1 Technique de prélèvement……....13

IV.2 Conditionnement et transport des échantillons……....13

V. PREPARATION DES DILUANTS, SUSPENSIONS MERE, DILUTION EN CASCADE ET MILIEUX DE CULTURE……....14

V.1 Préparation du diluant……14

V.2 Préparation de la suspension mère selon la norme NFV O8-002……...14

V.3 Préparation des dilutions en cascade selon la norme NFV 08-010……14

V.3 Préparation des milieux de culture……14

VI. DENOMBREMENT DES GERMES A ETUDIER……...15
VI.1 Dénombrement des Coliformes……15
a- Principe.……....15
b- Ensemencement et incubation……...15
c- Comptage……..15
VI.2 Dénombrement d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive 44°C……..15
a- Principe……..15
b- Ensemencement…….16
c- Comptage……..16
VI.3 Dénombrement d'*Escherichia coli*……...16
a- Principe……..16
b- Ensemencement et incubation……...16
c- Comptage……..17
VI.4 Dénombrement de FAMT…….17
a- Principe……..17
b- Ensemencement et incubation……...17
c- Comptage……..17
VI.5 Dénombrement de Staphylocoque à coagulase positif 37°C
a- Principe……..17
b- Ensemencement et incubation……...18
c- Comptage……..18
VII. RECHERCHE DES GERMES PATHOGENES…….18
VII.1 Recherche de *Vibrio spp*……..18
a- Principe..……...18
b- Incubation…….18
c- observation……....18
VII.2 Recherche de *Salmonella*..…….....19
1- Pré-enrichissement sélectif……...19
a- Principe……...19
b- Mode opératoire……..19
2- Culture sur milieu HEA……....19
a- Principe……...19
b- Mode opératoire……..19
c- Observation……....19

VIII. EXPRESSION DES RESULTATS : ISO 7218…….....20
IX. METHODES D'INTERPRETATION…….....20
X. CRITERE MICROBIOLOGIQUE DE REFERENCE POUR L'ETUDE…….21
RESULTATS ET DISCUSSIONS…….22
I. ENQUETES AUPRES DES SITES D'ECHANTILLONNAGES…….22
II. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES……...23
II.1 Flore aérobie mésophile totale……...24
II.2 Germes indicateur contamination fécale (IFC): *E.coli*, *E.coli* β-glucuronidase positive 44°C, CT, CT…….25
II.3 Germe indicateur de contamination humaine : Staphylocoques à coagulase positif 37°C…….....27
II.4 Germes pathogènes : *Vibrio spp* et *Salmonella sp*…….27

DISCUSSIONS.....28
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES……...30

GLOSSAIRE

Aérobie : adjectif désignant un microorganisme qui se développe en présence d'oxygène.

Anaérobie : adjectif désignant un microorganisme qui se développe en absence d'oxygène.

Aéro-anaérobie : adjectif désignant un microorganisme capable de se développe en présence ou en absence d'oxygène.

Bactéries mésophiles : ce sont des bactéries aptes à se multiplier en aérobie dont la température optimale de croissance est située entre 20°C et 40°C.

Bactéries pathogènes : bactéries qui peuvent pénétrer dans l'organisme et causer des troubles plus ou moins sévères en se développant au détriment de cet organisme.

Bactéries thermotolérants : bactéries aptes à se multiplier à une température optimale de croissance comprise entre 40 et 50°C.

Conchyoline: La conchyoline ou perlucine est un complexe de macromolécules organiques, des protéines fibreuses chitinoïdales et des polysaccharides, qui sont sécrétées par le manteau des mollusques. Ces complexes se lient avec des cristaux d'aragonite pour former la structure rigide qui permet la construction de leur coquille.

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point. Système qui permet d'identifier le ou les dangers spécifiques, de les évaluer et d'établir les mesures
préventives pour les maîtriser.

Inoculum : volume contenant le germe à ensemencer pendant les analyses microbiologiques.

Intoxication : Conséquence de l'ingestion d'un aliment dégradé par les bactéries en catabolites toxiques.

Pathogène opportuniste : un agent pathogène opportuniste est un micro-organisme qui ne provoque habituellement pas de maladie mais qui peut devenir pathogène dans certaines conditions, lorsque le système immunitaire et la résistance de l'individu sont affaiblis.

Toxi-infection : Conséquence de l'ingestion massive de bactéries et de toxines dans l'aliment.

Toxine : une toxine est définie comme une "substance toxique élaborée par un organisme vivant (bactérie, champignon vénéneux, insecte ou serpent venimeux), auquel elle confère son pouvoir pathogène".

Syndrome hémolytique et urémique : parfois surnommé maladie du hamburger, est une affection potentiellement grave affectant principalement les enfants de bas âge (moins de trois ans). Il est toujours précédé d'une diarrhée, généralement sanglante, entrant dans un tableau de gastro-entérite aiguë, souvent accompagnée de fièvre.

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation

$\mathbf{a_W}$: activity water

BP: Baird Parker

CF: Coliformes Fécaux

CT: Coliformes Totaux

EMB: Eosin Methylen Blue

EPSA: Eau Peptonée Saline

FAMT: Flore Aérobie Mésophile Totale

FAO: Food and Alimentation Organisation

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

HEA: Hektoen Enteric Agar

ISO : International Standard Organisation

NF : Norme Française

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCA : Plate Count Agar

pH : Potentiel d'hydrogène

RVS : Rappaport Vassiliadis Soja

TIA : Toxi-infection Alimentaire

TBX : Tryptone Bile X-glucoronide

TCBS: Thiosulfate Citrate Bile Saccharose

VRBL : Violet Red Bile Lactose

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Huître d'espèce *Ostrea margaritacea*……2

Figure 2 : Evaluation sur la propreté des matériels utilisés et sur la propreté des vendeurs….22

Figure 3 : Dénombrement de FAMT sur gélose PCA exprimé en UFC/g…….....24

Figure 4 : Colonies de Flore aérobie mésophile totale sur milieu PCA…….....24

Figure 5 : Dénombrement des germes indicateurs contamination fécale…….....25

Figure 6 : Colonies de Coliformes fécaux sur milieu VRBL…….....26

Figure 7 : Colonies de Coliformes totaux sur milieu VRBL……26

Figure 8 : Colonies d'*Escherichia coli* sur milieu EMB……...26

Figure 9 : Dénombrement des Staphylocoques à coagulases positif 37°C sur milieu BP……26

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition nutritionnelle de l'huître en macroéléments……...4

Tableau 2 : Composition nutritionnelle de l'huître en sels minéraux…….4

Tableau 3 : Composition nutritionnelle de l'huître en vitamines……5

Tableau 4 : Critère microbiologique de référence pour l'huître……...21

Tableau 5 : Résultats de l'analyse microbiologique de l'huître pour chaque site d'échantillonnage……..23

INTRODUCTION

Chaque jour, partout dans le monde, des gens tombent malades en raison des aliments qu'ils consomment. Ces affections sont appelées maladies d'origine alimentaire et sont provoquées par des micro-organismes pathogènes ou des substances chimiques toxiques. Bien que les gouvernements du monde entier fassent de leur mieux pour améliorer la sécurité sanitaire des aliments, la prévalence des maladies d'origine alimentaire reste un problème important de santé publique dans tous les pays. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estime que 1.800.000 personnes meurent chaque année des suites de maladies diarrhéiques, et que la plupart de ces cas peuvent être attribués à des denrées ou à de l'eau contaminées (OMS, 2007). La mauvaise hygiène est un des problèmes majeurs de santé publique [FAO, 2002] particulièrement dans les pays en voie de développement comme Madagascar. Ainsi, le contrôle des maladies infectieuses d'origine alimentaire par l'usage des bonnes pratiques d'hygiène revêt une importance capitale pour le développement des populations.

La consommation des huîtres et des moules dans la rue est devenue une tendance pour les tananariviens non seulement à cause de leur important apport en calcium et en iode, mais aussi par leur prix accessible qui est de 600 Ar la douzaine. L'huître, qui est un mollusque bivalve, est une excellente source de vitamine B12, de cuivre, de fer, de zinc, ainsi que de plusieurs autres nutriments [E.JOUZIER, 1998]. De plus, la teneur lipidique de l'huître, légèrement supérieur à celui des autres fruits de mer, lui donne l'avantage d'être une bonne source de vitamines A et D, ces vitamines n'étant solubles que dans l'huile. Pourtant, la qualité sanitaire de ce mollusque est très inquiétante vu la contamination pouvant survenir. Jusque-là, très peu de travaux ont porté sur la bactériologie de ces fruits de mer à Madagascar et c'est pour combler ce vide que cette recherche a été menée.

Le présent mémoire se propose d'étudier la qualité bactériologique des huîtres vendues sur les marchés de la ville d'Antananarivo. Ainsi ce travail comporte quatre parties, la première partie est consacrée à l'étude bibliographique effectuée sur l'huître, sur les germes à rechercher et aux généralités sur les qualités et hygiènes. La deuxième partie portera sur les matériels et les méthodes utilisés. Les résultats d'analyses faites sur les huîtres, suivis de la discussion sont rassemblés dans la troisième partie. Enfin, la dernière partie sera consacrée à la conclusion et aux perspectives.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LES HUITRES

I.1 Description

Le terme huître recouvre un certain nombre de groupes de mollusques marins bivalves qui se développent en mer. Les bivalves ne vivent que dans de l'eau salée et se trouvent dans toutes les mers. L'huître présente une anatomie caractéristique des lamellibranches. La coquille se compose d'aragonite et de protéines comme la conchyoline. Le manteau constitue la structure la plus externe du corps mou de l'huître. Il correspond à la membrane qui se rétracte lorsqu'on la pique ou qu'on l'asperge de citron, le manteau est un tissu conjonctif qui contient des muscles, des vaisseaux sanguins et des nerfs. Une grande partie de l'intérieur de l'huître est occupée par les branchies. Elles ont un rôle respiratoire, mais également nutritionnel. En effet, les cils présents sur les axes des branchies créent un courant d'eau qui permet l'acheminement vers la bouche des particules nutritives dont se nourrit l'animal. Comme les autres lamellibranches, l'huître ne possède pas de tête. Un muscle adducteur important permet de contrôler l'ouverture de la coquille. C'est ce muscle qui maintient l'huître fermée et que l'on doit couper lors de l'ouverture de la coquille. L'huitre est hermaphrodite cyclique. En effet, une année sur l'autre, elle sera tantôt femelle, tantôt mâle. Lorsque la température de l'eau dépasse 10 °C, elle produit ses gamètes qu'elle libère lorsque l'eau atteint une température proche de 18 °C. Une huître libère entre 20 et 100 millions d'ovules et encore plus de spermatozoïdes. Seules 10 % des larves formées atteindront l'âge adulte.

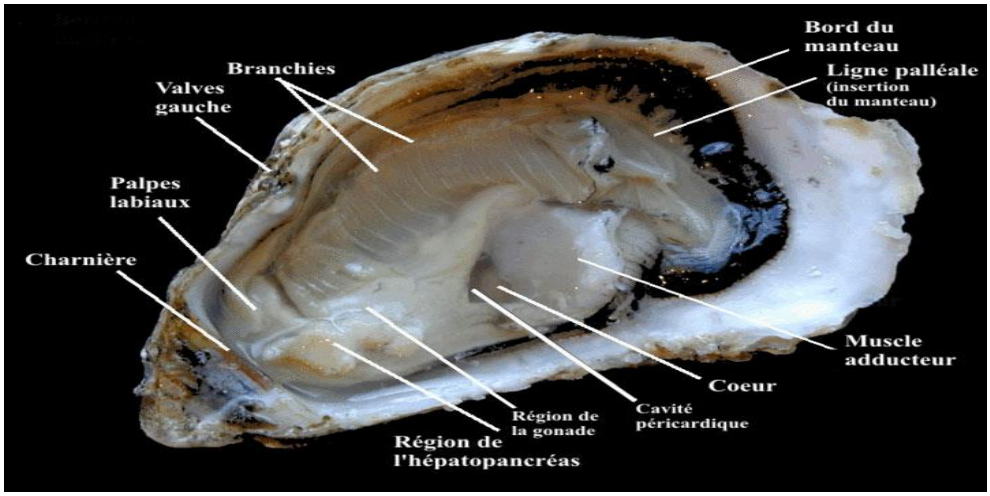


Figure 1 : Huître d'espèce *Ostrea margaritacea*

I.2 Classification

La classification des huîtres de ce genre est rendue délicate par le large polymorphisme (variété des formes) des coquilles.

Règne : **ANIMALIA**

Embranchement : **MOLLUSCA**

Classe : **BIVALVIA**

Sous-classe : **PTERIOMORPHIA**

Ordre : **OSTREOIDA**

Famille : **OSTREIDAE**

Genre : ***Ostrea***

Espèce : ***margaritacea***

Noms vernaculaires : **huître, oyster, masaja** (en malgache)

II. VALEURS NUTRITIONNELLES ET THERAPEUTIQUES

II.1 Valeurs nutritionnelles

L'huître contient divers éléments nutritifs. Elle possède une valeur nutritionnelle très intéressante grâce à ses différents constituants : glucides, protéines, lipides qui sont les éléments énergétiques proprement dits, des sels minéraux et des vitamines indispensables à la bonne utilisation de cette énergie.

II.1.1 Les macroéléments

L'huître est très riche en protéines et pauvre en calories, en graisses et en cholestérol. C'est un aliment de choix en raison de ses apports nutritifs exceptionnels mais rares dans le reste de l'alimentation. La composition nutritionnelle en macroéléments de l'huître est représentée dans le tableau 1

Tableau 1 : Composition nutritionnelle de l'huître en macroéléments

Les macronutriments	100 g de chair (environ 2 huitres)
Valeur énergétique	81 Kcal
Protéines	9,4 g
Glucides	4,9 g
Lipides	2,3 g

Source : [M. DRAME, 1994]

II.1.2 Les minéraux et vitamines

II.1.2.1 Les sels minéraux

La chair de l'huître contient presque tous les éléments. On peut constater que l'huître est riche en fer et possède une forte teneur en calcium. Toutefois le taux de calcium ne permet pas, à lui seul, de couvrir les besoins calciques journaliers. Notons cependant que, du fait de leur teneur en chlorure de sodium, les huîtres ne sont pas conseillées dans les régimes sans sel. Différents facteurs entraînent les variations de taux des éléments minéraux et les valeurs indiquées ne sont que des moyennes (en mg/100 g de chair).

Tableau 2 : Composition nutritionnelle de l'huître en sels minéraux

Les sels minéraux	Moyennes en mg/100g de chair
Calcium	50 à 200
Magnésium	20 à 400
Sodium	200 à 350
Fer	3 à 25
Potassium	200 à 350
Zinc	1 à 100
Cuivre	0,3 à 10
Chlore	400 à 600
Iode	0,005 à 0,4
Soufre	100 à 200
Phosphate	200 à 350
Manganèse	0,3 à 0,5

Source : [E. JOUZIER, 1998]

II.1.2.2 Les vitamines

L'huître contient plus de vitamines (toutes vitamines confondues) que le poisson qui, lui-même, est plus riche que la viande. La teneur en vitamine C est exceptionnelle pour le règne animal. L'huître contient toutefois moins de vitamine C que l'orange ou la tomate, mais bien plus que certains fruits et légumes. Voici les teneurs moyennes des vitamines de l'huître crue (en mg / 100 g).

Tableau 3 : Composition nutritionnelle de l'huître en vitamines

Les vitamines	Moyennes en mg/100g de chair
Vitamine C	**3 à 20**
Vitamine B1	**0,15 à 0,20**
Vitamine B2	**0,10 à 0,50**
Vitamine A	**0,009**
Vitamine D	**0,005**
Vitamine PP ou B3	**0,01 à 2**
Vitamine B12	**0,0037**
Acide folique	**0,0072 à 0,009**
Biotine	**0,5**

Source : [E. JOUZIER, 1998]

II.2 Valeurs thérapeutiques

L'huître contient de l'acide eicosapentaénoïque (**AEP**) et de l'acide docosahexaénoïque (**ADH**), deux acides gras de la famille des oméga-3. L'huître est une très bonne source de ces deux acides gras, fournissant une quantité comparable à certains poissons gras tels le maquereau et la sardine. Les acides gras oméga-3 agissent comme précurseurs de messagers chimiques favorisant un bon fonctionnement des systèmes immunitaires, circulatoires et hormonaux.

III. PRESENTATION DES DIVERS GERMES CONTAMINANT LES ALIMENTS

III.1 Flore Aérobie Mésophile *Totale* (FAMT)

Cette flore est apte à se multiplier en aérobie, aux températures moyennes, plus précisément celles dont la température optimale de croissance est située entre 25 et 45 °C. Le dénombrement de la FAMT est la meilleure méthode d'appréciation de la qualité microbiologique des aliments [MISKIM et Coll. 1998]. Elle renseigne sur la charge microbienne globale de l'aliment, reflétant ainsi sa qualité microbiologique [GIRAUD, 1998]. Le dénombrement de la FAMT est une excellente méthode permettant d'estimer l'indice de salubrité et de qualité des aliments [Bonnefoy, 2002 ; Guiraud, 1998].

III.2 Coliformes totaux

Les coliformes totaux sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale. Ce sont des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme ß-galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 35°C afin de produire des colonies rouges avec reflet métallique sur un milieu gélosé approprié. Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia.* La presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé [EDBERG *et al.* 2000; OMS, 2000], à l'exception de certaines souches d'*Escherichia coli (E. coli)* ainsi que de rares bactéries pathogènes opportunistes.

III.3 Coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des *coliformes totaux* capables de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* (*E. coli*) et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* [ELMUND *et al.*, 1999., EDBERG *et al.*, 2000]. La bactérie *E. coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermotolérants détectés [BARTHE *et al.* 1998; EDBERG *et al.*, 2000]. Bien que la présence de *coliformes fécaux* témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale, plusieurs coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale, provenant plutôt

d'eaux enrichies en matière organique, tels les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de la transformation alimentaire [BARTHE *et al.* 1998; OMS, 2000].

III.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif aéro-anaérobie facultatif ; oxydase négative, catalase nitrate réductase positive ; isolé, groupé par deux ou plus rarement en amas, ubiquitaire ; asporulé, parfois capsulé, et résiste bien à la chaleur ; mobilité péritriche très réduite. Cette bactérie se développe dans une gamme étendue de ph c'est-à-dire entre 4,4 et 9, avec optimum de 6 à 7, pour une valeur de l'activité de l'eau A_W de 0,95 minimum et dans un intervalle de température de 10°C à 45°C avec un optimum à 37°C. Découverte en 1885 par Théodore ESCHERICH, les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux de l'appareil digestif des animaux et des êtres humains. Seules certaines de leurs souches se sont étroitement adaptées au point d'entraîner des diarrhées et diverses affections extra-intestinales. Depuis 1977, certaines souches de *E. coli* responsables de diarrhées ont été reconnues capables de produire des toxines qui ont un effet cytopathogène irréversible sur des cultures de cellules Vero. Ces *E.coli* dits vérocytotoxinogènes (VTEC pour Verocytotoxigenic E. coli) appartiennent à plus de 100 écotypes différents. Escherichia coli *O157:H7*, qui est le sérotype le plus important et le plus virulent, appartient à un sous-groupe pathogène de VTEC appelés E. coli entérohémorragiques (EHEC pour Enterohaemorrhagic E. coli). Les *Escherichia coli* sont caractérisés, en routine, par l'identification sérologique de leurs antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires K. Elles sont abondantes dans les selles et sont recherchées à ce titre comme témoin de contamination fécale dans l'eau et les aliments [RASOLOFONIRIANA, 1989].

III.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique, à Gram positif, immobile, asporulée, aéro-anaérobie facultatif, possédant une catalase et une coagulase. Staphylococcus se développe à une température minimale de 7°C, optimale de 37°C ; un pH minimal de 4 ; activité de l'eau A_W minimale de 0,86. Staphylococcus est un parasite saprophyte de l'homme et de l'animal ; son principal habitat est la muqueuse du nez, la bouche, la gorge et la peau d'individus sains. Il peut se disséminer facilement dans l'environnement et contaminer les aliments causant des gastroentérites. Les staphylocoques produisent des enzymes comme la coagulase, la

leucocidine, les hémolysines, la phosphatase et la désoxyribonucléase. La coagulase est la principale enzyme recherchée pour établir la nature « aureus » d'un staphylocoque.

III.6 *Vibrio spp*

Ce genre bactérien se caractérise bien sur le plan morphologique: bacilles à Gram-négatif incurvés, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8 µm et une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 µm. Ils présentent une mobilité polaire due à un seul flagelle. Ils sont aéro-anaérobies facultatives. Ils croient à valeurs de pH allant de 7,5 à 9,2. Leurs caractères nutritifs leur permettent de supporter de fortes concentrations de sel et donc de survivre dans divers environnements hydriques (eaux de mer, eaux saumâtres). La contamination est donc le plus souvent alimentaire ou hydrique. *Vibrio* est un genre bactérien autochtone de l'environnement aquatique. Certaines espèces de ce genre sont fréquemment isolées dans les eaux côtières à climats tempéré et tropical. Les fruits de mer sont identifiés comme une source de bactéries pathogènes qui posent des problèmes de santé publique, particulièrement les espèces du genre *Vibrio*. Il y a approximativement 70 espèces connus dans le genre *Vibrio*. Deux espèces de vibrions présentent des risques de toxi-infections alimentaires pour l'homme, *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*. La prévention des infections humaines à vibrions, consécutives à la consommation des produits de la pêche, est étroitement associée à l'amélioration des méthodes d'identification des souches pathogènes.

III.7 *Salmonella sp*

Les *salmonelles* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et plus de 2000 sérovars ont été identifiés. Ce sont des bacilles mésophiles à Gram négatif non sporulé. Ils sont rencontrés principalement dans les intestins de l'homme et des animaux et dans les milieux naturels pollués par des excréments humains ou animaux. Toutes les variétés d'aliments sont susceptibles d'être contaminées mais ils sont surtout retrouvés dans les eaux polluées et les produits consommés crus. Les *salmonella* sp se distinguent les unes des autres par l'expression de leurs multiples antigènes somatique (O), flagellaires(H) et capsulaires (K), et par leurs différents profils biochimiques. Les sérotypes *Salmonella thyphi* et *Salmonella paratyphi* A, B et C provoquent des maladies infectieuses et graves : la fièvre typhoïde et paratyphoïde.

IV QUALITE ET HYGIENE

IV.1 QUALITE DES ALIMENTS

IV.1.1 Définition

Selon la norme AFNOR NF X 50-120 : la qualité d'un produit ou d'un service est son aptitude à satisfaire les besoins des utilisateurs [LARPENT, 1997].

Selon la norme ISO 8402 : la qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins exprimés ou implicites de tous les utilisateurs [FROMAN. B, 1995].

IV.1.2 Composantes de la qualité

Les composantes de la qualité doivent répondre aux exigences des consommateurs. Ces composants sont connus sous le nom de 4S qui sont la Sécurité, la Santé, la Saveur ainsi que le Service [AFNOR, 1988].

Sécurité : absence de danger biologique, chimique et physique dans le produit.

Santé : aptitude de l'aliment à apporter des nutriments et éléments indispensables à l'organisme pour assurer son bon fonctionnement.

Saveur : elle concerne le goût du produit.

Service : la facilité d'utilisation du produit.

IV.1.3 Différents types de la qualité

La qualité alimentaire comprend: la qualité nutritionnelle, la qualité hygiénique, la qualité organoleptique, la qualité technologique et la qualité marchande.

IV.1.3.1 La qualité nutritionnelle

Il s'agit de la composition de l'aliment en macronutriments (glucides, lipides, protéines) et micronutriments (vitamines, oligoéléments) ainsi que la disponibilité digestive et métabolique de ces nutriments dans l'organisme.

IV.1.3.2 La qualité hygiénique

La qualité hygiénique englobe la qualité microbiologique et la qualité toxicologique. Donc la qualité hygiénique des aliments est conditionnée par l'absence des microorganismes pathogènes et/ou de leur toxine [JOUVE, 1993].

IV.1.3.3 La qualité organoleptique

Cette qualité est déterminée en utilisant les 5 organes de sens : la vue, le toucher, le goût, l'odorat et l'ouïe, ces organes entrent en jeu pour apprécier la qualité organoleptique d'un aliment [CHEFTEL, 1990].

Les propriétés organoleptiques peuvent se subdiviser comme suit :

L'apparence (forme, aspect et couleur) relevant de la vision.

La flaveur (arôme et saveur) relevant du goût et de l'odorat.

La texture (consistance, résistance à la mastication) relevant du toucher.

IV.1.3.4 La qualité technologique

Il s'agit de l'aptitude du produit à être transformé et distribué. Cette qualité se base sur la manière dont l'aliment a été produit depuis la production jusqu'à la transformation. Elle prend en compte le contrôle de certains critères comme le comportement de l'aliment dans les différents modes de cuisson, le temps de préparation, la conservation du produit [ANONYME, 2006].

IV.1.3.5 La qualité marchande

Elle se base sur les caractéristiques organoleptiques du produit qui provoqueront ensuite l'attrait ou la répugnance des consommateurs [GUIRAUD J et col 1998]. La qualité marchande consiste en l'existence des caractères autorisés ou imposés par la réglementation, correspondant à la composition, la préparation, la présentation et l'étiquetage.

IV.2 HYGIENE DES ALIMENTS

IV.2.1 Définition

Selon la norme AFNOR NF V 01-002, l'hygiène des aliments est l'ensemble de mesures et de conditions nécessaires pour la sécurité et la salubrité des aliments à toutes les étapes de la chaine alimentaire.

IV.2.2 Importance de l'hygiène des aliments

Selon l'OMS, l'hygiène vise l'ensemble des mesures nécessaires pour assurer ou renforcer l'innocuité d'aliments donnés ou de denrées alimentaires en général. L'hygiène a donc pour but la protection des consommateurs contre les risques sanitaires en leur fournissant des aliments salubres et de bonne conservation [OMS, 2001 ; JOUVE, 1993]. Pour parvenir à ce but, il importe de respecter un comportement adéquat dans les différents domaines de l'hygiène à savoir l'hygiène du personnel, la manipulation et stockage des aliments ainsi que l'environnement des denrées alimentaires.

IV.2.3 La sécurité des aliments

La "sécurité des aliments" ou "sécurité sanitaire des aliments" est la garantie de l'innocuité des produits alimentaires, c'est-à-dire que leur consommation n'aura pas de conséquences néfastes sur la santé. Elle est l'une des composantes de la sécurité alimentaire.

IV.2.4 La salubrité des aliments

La salubrité des aliments est l'assurance des aliments qui sont consommés conformément à l'usage au quel ils sont destinés et qui sont acceptables pour la consommation humaine. Elle concerne les caractéristiques intrinsèques du produit, à savoir le goût, l'odeur, la texture ainsi que la présentation du produit. Dans le cas d'insalubrité, la perte du produit est probable et l'insécurité conduira à la perte du consommateur.

MATERIELS ET METHODES

I. LES MATERIELS UTILISES

I.1 Produits analysés

Les produits analysés sont constitués par la partie interne de la coquille des huitres. Ce sont les branchies, l'intestin, l'estomac, et le muscle adducteur.

I.2 Matériels de prélèvement

Ils comprennent les éléments suivants :

- Des sachets stériles dans lesquels sont distribués les échantillons
- Un coffre isotherme ou une glacière est utilisé pour transporter les échantillons jusqu'au laboratoire.

I.3 Matériels et équipements de laboratoire

L'utilisation des matériels de laboratoire non conformes pour des études microbiologiques influence fortement la qualité des germes analysés et peut fausser les résultats. Par conséquent, l'emploi de matériels et équipements standards pour ces analyses sont de rigueur et ils doivent être conformes à la norme NF ISO 7218 : 1996 relatifs aux règles générales pour les examens microbiologiques [AFNOR, 1996]. Les matériels de laboratoire sont divisés en 3 grands groupes :

- Les verreries : Les ballons, béchers, erlenmeyers, éprouvettes graduées, boîtes de Pétri de 90 à 100 mm de diamètre, et pipettes graduées.
- Les petits matériels : vortex, plaque chauffante à agitateur magnétique, balance de précision, anse d'ensemencement, spatule, bec Bunsen.
- Les gros matériels : autoclave, étuve d'incubation, étuve de stérilisation, réchaud électrique, hotte à flux laminaire verticale, distillateur.

II. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage des huîtres a été réalisé auprès des deux grossistes (Petite vitesse et Antomadinika) et trois vendeurs (Analakely, Mahamasina et Andravohangy) qui se trouvent dispersés dans la ville d'Antananarivo. Ces 5 sites d'échantillonnages vendent leurs produits sur un lieu fixe.

III. ENQUETE AUPRES DES VENDEURS ET GROSSISTES DE L'HUITRE

Une enquête sur les vendeurs et grossistes a été effectuée au niveau des arrondissements de la commune urbaine d'Antananarivo. Cette enquête a pour objectif de déterminer les différents paramètres (la propreté des vendeurs, la provenance des huîtres, le prix unitaire…) au niveau de ces sites de vente de l'huître. Pour cela des questions ont été posées auprès de ces vendeurs et ces grossistes. Les fiches d'enquête sont figurées dans l'annexe 1

IV. METHODES DE PRELEVEMENT

IV.1 Technique de prélèvement

La qualité des résultats d'analyses microbiologiques repose essentiellement sur les techniques de prélèvement (GUIRAUD, 1998). Le prélèvement se fera alors avec un double souci : le souci statistique de faire un prélèvement représentatif de la denrée étudiée et le souci bactériologique de ne pas modifier la microflore du produit et en particulier de ne pas apporter des microorganismes étrangers.

Les prélèvements ont été réalisés avec des matériels stériles (sachets stériles) ; ils ont été effectués 3 heures avant notre départ au laboratoire à Antsirabe.

IV.2 Conditionnement et transport des échantillons

Il est indispensable qu'aucune contamination extérieure ne vienne fausser la composition de la flore microbiologique à étudier. Pour ce faire, des précautions ont été prises pour conserver qualitativement et quantitativement la flore présente.

Chaque échantillon prélevé a été conditionné dans des sachets stériles soigneusement fermés et étiquetés avec mention du code de l'échantillon, la date, l'heure et le lieu de prélèvement puis mis dans une glacière. Ces échantillons sont acheminés au laboratoire le plus rapidement possible.

V. PREPARATION DES DILUANTS, SUSPENSIONS MERE, DILUTIONS EN CASCADE ET MILIEUX DE CULTURE

V.1 Préparation du diluant

Le diluant utilisé est l'eau peptonée saline (EPSA), autoclavée à 121°C pendant 15 min avant de l'utiliser comme diluant lors de la préparation de la suspension mère et la série de dilution en cascade.

V.2 Préparation de la suspension mère selon la norme NF V 08-002

Les huîtres, une fois au laboratoire, subissent un lavage à l'eau puis un brossage pour éliminer la boue, les sables et les impuretés présentes sur la coquille. Après séchage rapide sur la paillasse, l'ouverture des coquilles a été réalisée. Le point d'ouverture, du côté de la charnière, a été aseptisé par un tampon d'alcool ou par un passage bref à la flamme du bec Bunsen. L'écaillage a été effectué dans la zone aseptique de travail à l'aide d'un couteau à huître préalablement stérilisé. La chair et l'eau intervalvaire ont été récupérées dans une boite de Pétri stérile. Ensuite, 25 g de chaque échantillon ont été pesés aseptiquement. Après pesage, les 25 g sont transférés dans un ballon stérile puis 225 ml d'EPSA stérile ont été ajoutés. Ce ballon a été agité pendant quelques minutes pour favoriser la suspension homogène des germes provenant des 25 g de l'huître. Ensuite, ce ballon a été laissé reposer pendant 20 min.

V.3 Préparation des dilutions en cascade selon la norme NF V 08-010

Une dilution en cascade est effectuée à partir de la suspension mère. 1 ml de la solution mère a été versé dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile : c'est la dilution au 1/10(10^{-1}). 1ml de ce mélange est ensuite versé dans un autre tube puis ramené à 10 ml avec de l'eau distillée stérile : cette solution correspond à la dilution 10^{-2} et ainsi de suite jusqu' à la dilution voulue. Les tubes ont été homogénéisés sur un vortex

V.4 Préparation des milieux de culture

La préparation des milieux de culture est différente pour chaque milieu utilisé. Elle est repartie selon chaque milieu dans l'annexe 2

VI. DENOMBREMENT DES GERMES A ETUDIER

VI.1 Dénombrement des Coliformes

Le dénombrement des coliformes totaux a été effectué selon la norme NF V 08-060 et celui des coliformes fécaux selon NF V 08-050. Le principe et l'ensemencement sont les mêmes pour ces deux coliformes, ils différent seulement par la température d'incubation.

a) Principe

Il est basé sur l'utilisation de milieu de culture gélosé sélectif VRBL qui inhibe la croissance des bactéries à Gram positif. Ce milieu contient du lactose, les colonies de Coliformes totaux fermentant le lactose se coloreront en rouge foncé et/ou en rouge violacée due à la précipitation de la bile.

b) Ensemencement et incubation

A l'aide d'une pipette stérile, 1ml de la dilution 10^{-1} a été transféré dans deux boîtes de Pétri stériles. Moins de 15 min après ce transfert, 15ml du milieu VRBL à 45°C ont été coulés dans ces boîtes de Pétri. L'inoculum a alors été mélangé au milieu en surfusion par agitation de façon à obtenir une répartition homogène des germes dans la masse du milieu. Après, ces boîtes de Pétri ont été posées sur une surface horizontale pour la solidification du milieu. Après solidification, les boîtes ont été retournées (couvercle vers le bas) et mises en incubation à 30°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les Coliformes fécaux.

c) Comptage

Après incubation, les colonies caractéristiques de Coliformes totaux et Coliformes fécaux de diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm de couleur rouge foncé ou rouge violacé ont été comptées.

VI.2 Dénombrement d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive 44°C selon la norme NF ISO 16649-2

a) Principe

Le principe est basé sur l'utilisation du milieu TBX qui possède une propriété sélective et chromogénique. Ce milieu inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et

révèle la présence de colonie d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive par une coloration bleue. La colonie produisant cette coloration est dite caractéristique.

b) Ensemencement et incubation

L'ensemencement consiste à transférer 1ml de l'inoculum provenant de solution mère dans une boîte de Pétri stérile. Au moins 15 minutes après ce transfert, 15 ml du milieu TBX maintenu en surfusion ont été coulés dans cette boîte de Pétri. Ensuite, le tout a été mélangé par agitation de façon à obtenir une répartition homogène des germes dans la masse. Enfin, la boîte de Pétri a été posée sur la paillasse pour solidifier le milieu à température ambiante. Après solidification du milieu, la boîte de Pétri a été retournée et mise en incubation à 44°C±0,1°C, pendant 18 à 24h.

c) Comptage

Après incubation, les colonies caractéristiques d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive 44°C de couleur bleue ont été comptées pour chaque échantillon.

VI.3 Dénombrement d'*Escherichia coli* selon la norme NF V 08-053

a) Principe

Le milieu EMB est sélectif pour *Escherichia coli* par la présence de deux colorants (l'éosine et le bleu de méthylène) qui inhibent la croissance de la majeure partie de la flore à Gram positif. *Escherichia coli* produit des colonies de couleur vert noirâtre à reflets métalliques.

b) Ensemencement et incubation

La culture se fait en surface. Pour cela, un volume de 15 ml du milieu EMB a été coulé en surfusion dans une boîte de Pétri stérile. Ensuite après solidification du milieu, à l'aide d'une pipette stérile, 1ml d'inoculum provenant de la suspension mère a été ensemencé à la surface de la gélose. L'inoculum a été étalé sur toute la surface du milieu gélosé avec un racloire stérile sans toucher les bords de la boîte de Pétri. La boîte de Pétri a été retournée et incubée à 44°C pendant 24h.

c) Comptage

Après 24 h d'incubation, les colonies caractéristiques d'*Escherichia coli* de couleur vert noirâtre à reflets métalliques ont été comptées pour chaque échantillon.

VI.4 Dénombrement de la Flore Aérobie Mésophile Totale : FAMT selon la norme NFV 08-051

a) Principe

Il consiste à compter l'ensemble des bactéries capables de croître à 30°C. La gélose pour dénombrement ou PCA standard est un milieu électif et sans inhibiteur utilisé pour le dénombrement des microorganismes aérobies revivifiables. Les substances nutritives apportées par le tryptone, l'extrait de levure et le glucose favorisent la croissance de la majorité des microorganismes.

b) Ensemencement et incubation

La culture se fait en profondeur, à l'aide d'une pipette stérile, 1ml de la dilution décimale 10^{-3} a été transféré dans une boîte de Pétri stérile. Moins de 15 min après ces transferts, 15 ml du milieu PCA maintenu en surfusion ont été coulés dans la boîte de Pétri. Après ce coulage, l'inoculum a été mélangé au milieu en surfusion par agitation de façon à obtenir une répartition homogène des germes dans la masse. Ensuite la boîte de Pétri a été posée sur la paillasse pour la solidification du milieu. Enfin, la boîte de Pétri a été incubée à 30°C pendant 72h. Lors de cette incubation, ce boîte de Pétri a été retournée pour éviter la condensation du milieu produite par la culture.

c) Comptage

Après incubation, un comptage des colonies de FAMT de couleur blanche a été effectué sur la boite de Pétri.

VI.5 Dénombrement de Staphylocoques à coagulase positif 37°C selon la norme NF V 08-057-1

a) Principe

La gélose BAIRD PARKER (BP), milieu sélectif de couleur jaune, contient du chlorure de lithium et de la glycine en forte concentration qui inhibent la flore secondaire.

Le pyruvate et la glycine agissent comme accélérateur sélectifs de croissance pour les *Staphylocoques*.

b) Ensemencement et incubation

L'ensemencement se fait en surface, 15ml de la gélose BP ont été coulé dans une boîte de Pétri stérile. Après refroidissement et solidification du milieu, à l'aide d'une pipette stérile, 1ml d'inoculum provenant de la suspension mère a été ensemencé à la surface de la gélose. L'inoculum a été étalé sur toute la surface du milieu gélosé avec un racloire stérile. Enfin, la boîte de Pétri a été incubée à 37°C dans une étuve pendant 24h.

c) Comptage

Après 24h d'incubation, les colonies caractéristiques de Staphylocoques de couleur noire ont été comptées pour chaque échantillon.

VII. RECHERCHE DES GERMES PATHOGENES

VII.1 Recherche de *Vibrio* spp selon la norme NF ISO 8914 :05-1991

a) Principe

Le milieu sélectif pour *Vibrio* est le milieu TCBS. Sa composition est ajustée de telle sorte qu'elle inhibe la croissance des flores secondaires (bactéries à Gram positif et autres entérobactéries). Seul, *Vibrio* produit des colonies jaunes, verte ou bleu-vert. Les colonies de *Vibrio cholerae* sont caractérisées par des colonies jaunes, lisses, légèrement aplaties à centre opaque et à périphérie translucide de 2 à 3mm de diamètre. Par contre celles de *Vibrio parahaemolyticus* sont de couleur verte ou bleu-vert rondes, de 3 à 5 mm de diamètre.

b) Ensemencement et incubation

L'ensemencement se fait en surface.15 ml du milieu TCBS ont été coulés en surfusion dans une boîte de Pétri stérile. Après refroidissement et solidification du milieu, à l'aide d'une pipette stérile, 1ml d'inoculum provenant de la suspension mère a été ensemencé à la surface de la gélose et étalé sur toute la surface du milieu gélosé avec un racloire stérile. La culture a été retournée et incubée à 37°C pendant 24h.

c) Observation

Après 24H d'incubation, les colonies de *Vibrio spp* ont été observées.

VII.2 Recherche de *Salmonella* selon la norme ISO 579 : 2002, NF V 08 052

1) Pré-enrichissement sélectif

a. Principe

Le bouillon de Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) est utilisé pour l'enrichissement sélectif des Salmonelles. Ces derniers peuvent s'y multiplier grâce à la présence de vert malachite et de chlorure de magnésium.

b. Mode opératoire

10 ml de RVS a été versé dans un tube vissé stérile, à l'aide d'une pipette stérile. 1ml de la suspension mère a été transféré dans ce tube vissé. La préparation a été incubée à une température de 37°C pendant 24h.

2) Culture sur milieu Hektoen Enteric Agar (HEA)

a. Principe

Le milieu HEA est un milieu sélectif pour les Salmonelles. Il contient du bleu de bromothymol (ou BBT $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$), un indicateur de pH. Il permet de mettre en évidence une alcalinisation due à l'utilisation du citrate comme source de carbone par les salmonelles.

b. Mode opératoire

Après le pré-enrichissement, la culture a été repiquée. 15 ml du milieu HEA ont été coulés sur une boîte de Pétri stérile. Après refroidissement et solidification du milieu gélosé, la culture a été ensemencée avec une anse d'inoculation en faisant des stries au milieu de la boîte de Pétri. Le tout a été incubé pendant 24h à la température de 37°C.

c. Observation

La boîte a été examinée afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella* ainsi que les colonies atypiques susceptibles d'être des salmonelles. Si la croissance est faible et s'il n'y a pas de colonies typiques de salmonelle, la boîte est incubée de nouveau à l'étuve à 37°C pendant une nouvelle période de 18 à 24h. Sur gélose HEA, les colonies typiques de salmonelles sont de couleur rose entourée de rouge vif.

VIII. EXPRESSION DES RESULTATS SELON LA NORME ISO 7218

Le nombre total des colonies présentes dans 1g d'échantillon est calculé selon la formule ci-dessous

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0{,}1n_2) \times d} \times \frac{1}{V} \times \frac{V_{SM}}{V_{PR}}$$

N : nombre de microorganismes par gramme d'échantillon.

n_1 : nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible.

n_2 : nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.

d : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés : dilutions la plus faible

∑C : nombre total de colonies sur les boites retenues

V : volume de prise d'essai inoculé en ml

V_{SM} : volume de la suspension mère en ml

V_{PR} : volume de produit (ml) ou masse de produit(g) ou surface de produit (cm^2) ayant constitué la suspension mère

IX. METHODES D'INTERPRETATION

L'interprétation des résultats repose sur l'utilisation des plans à 2 classes ou à 3 classes. Lors de cette étude, le plan utilisé est celui à deux classes. Ce dernier permet d'avoir deux types de résultats :

- Si la concentration des microorganismes observée est inférieure à m, la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.
- Si la concentration des microorganismes observée est supérieure à m, la qualité du produit est considérée comme insatisfaisante. « **m** » correspond aux critères microbiologiques de référence.

m	
satisfaisante	**insatisfaisante**

X. CRITERE MICROBIOLOGIQUE DE REFERENCE POUR L'ETUDE

Un critère microbiologique est « un ensemble d'éléments qualitatifs et quantitatifs définissant les caractéristiques essentielles attendues d'un produit donné et qu'il est possible d'atteindre par des interventions appropriées » (Jean-Louis JOUVE, 1996).

Tableau 4 : Critères microbiologiques de référence pour l'huître

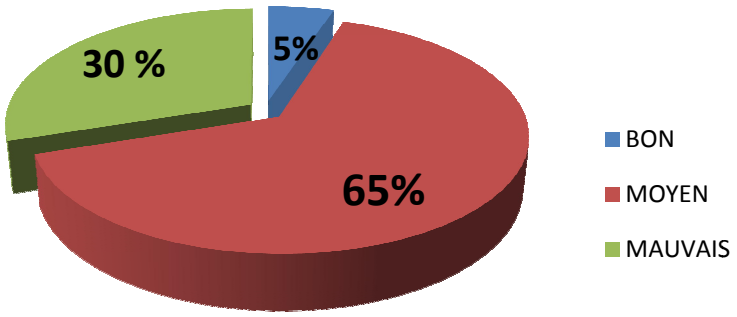
Microorganismes	Critères UFC/g
Coliformes Totaux	**1.10**
Coliformes Fécaux	**1.10**
FAMT	**1.10^5**
Staphylocoques à coagulase positif 37°C	**1.10^2**
Escherichia coli	**1.10**
***Escherichia* coli β-glucuronidase positive 44°C**	**1.10**
Vibrio spp	**Absence dans 25g**
Salmonella sp	**Absence dans 25g**

Source : laboratoire de microbiologie de l'ASJA

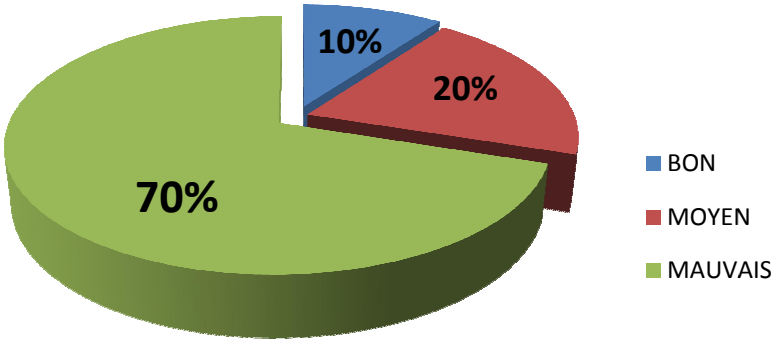
RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. ENQUETES AUPRES DES SITES D'ECHANTILLONNAGES

L'enquête auprès des grossistes a permis de connaitre la provenance des huîtres, le moyen de transport, la propreté des locaux et des vendeurs, et le montant moyen des huîtres. L'huitre provient de la ville de Majunga, le transport se fait par camion non frigorifique, il est entreposé avec des sacs en plastique sans être lavé.



Jugement de la propreté des vendeurs



Jugement de la propreté des matériels de coupe et de l'étal

<u>Figures 2 :</u> Evaluation sur la propreté des matériels utilisés et sur la propreté des vendeurs

Parmi les 5 sites d'échantillonnages, seulement 5% des vendeurs sont jugés comme propre c'est-à-dire qu'ils portent des vêtements propres et leur hygiène corporelle est bonne. 65% des vendeurs sont jugés moyen et 30% sont jugés malpropre. La plupart des vendeurs utilisent des matériels malpropres et inadéquats avec un taux de 70%, 20% des matériels sont jugés moyen et 10% seulement sont jugés bon.

II. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les moyennes des résultats d'analyse des germes trouvés pour chaque site d'échantillonnage sont représentées dans le tableau 1 sachant que les valeurs sont exprimées par gramme de l'huître analysé (UFC/g)

Tableau 5 : Résultats de l'analyse microbiologique de l'huître pour chaque site d'échantillonnage

Echantillons	FAMT	CT	CF	*E.coli*	*E.coli* β-glcnase	Staph	Salmo	*Vibrio*
H1	5.10^6	$2{,}1.10^4$	$1{,}5.10^4$	$1{,}4.10^2$	1.10^2	3.10^3	-	+
H2	$2{,}2.10^6$	$4{,}9.10^4$	$3{,}8.10^4$	$7{,}5.10^2$	$1{,}2.10^2$	$8{,}1.10^2$	-	+
H3	$2{,}5.10^6$	$2{,}9.10^5$	$3{,}5.10^4$	$9{,}2.10^2$	4.10^2	$4{,}6.10^3$	-	+
H4	$2{,}3.10^6$	$1{,}7.10^5$	$2{,}8.10^4$	$1{,}6.10^3$	$1{,}5.10^3$	$8{,}1.10^3$	-	+
H5	$2{,}5.10^6$	$1{,}7.10^5$	$5{,}6.10^4$	$1{,}4.10^3$	$5{,}1.10^2$	$6{,}7.10^2$	-	+
Moyenne	$2{,}9.10^6$	$1{,}2.10^5$	$9{,}8.10^4$	$9{,}7.10^2$	$5{,}5.10^2$	$3{,}4.10^3$	-	+
Critère microbiologique de référence	1.10^5	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10^2	Absence dans 25g	Absence dans 25g

N.B : H1 : Echantillon d'huîtres prélevées chez le grossiste petite vitesse.

H2 : Echantillon d'huîtres prélevées chez le grossiste Antohomadinika.

H3 : Echantillon d'huîtres prélevées chez le vendeur Analakely.

H4 : Echantillon d'huîtres prélevées chez le vendeur Mahamasina.

H5 : Echantillon d'huîtres prélevées chez le vendeur Andravoahangy

(-)= Résultat négatif

(+)= Résultat positif

FAMT : Flore aérobie mésophile totale, **CT** : Coliformes totaux, **CF** : Coliformes fécaux, **E.*coli*** : *Escherichia coli*, **E.*coli* β-glncase** : *Escherichia coli* β-glucuronidase positive 44°C, **Staph** : Staphylocoque à coagulase positif 37°C, **Salmo** : *Salmonella sp*, ***Vibrio*** : *Vibrio spp*

II.1 Flore aérobie mésophile totale : FAMT

Après 72 heures d'incubation à 30°C, les colonies bactériennes de couleur blanche apparaissent à la surface de gélose PCA.

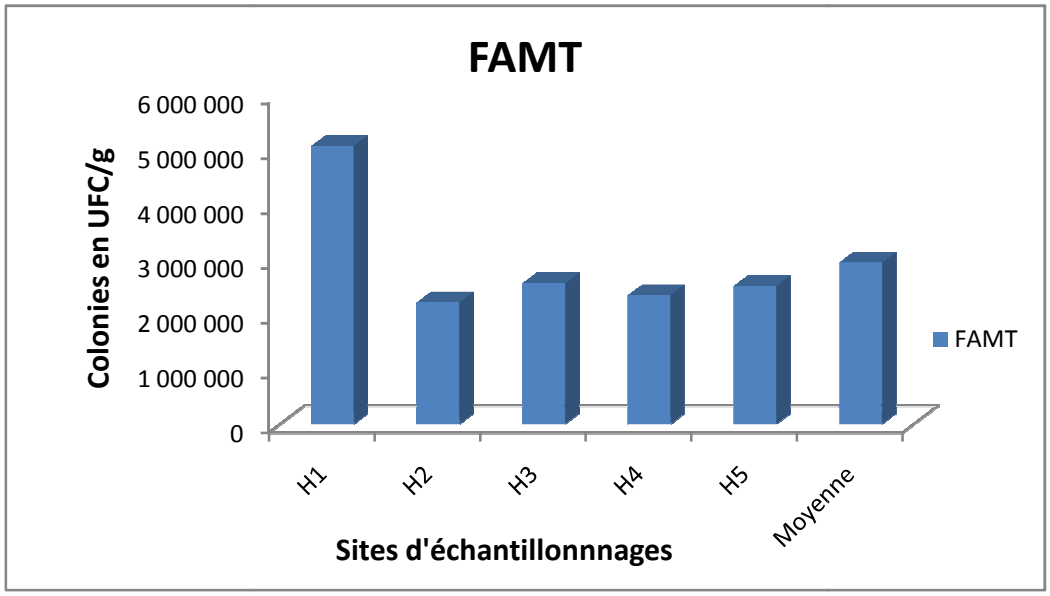
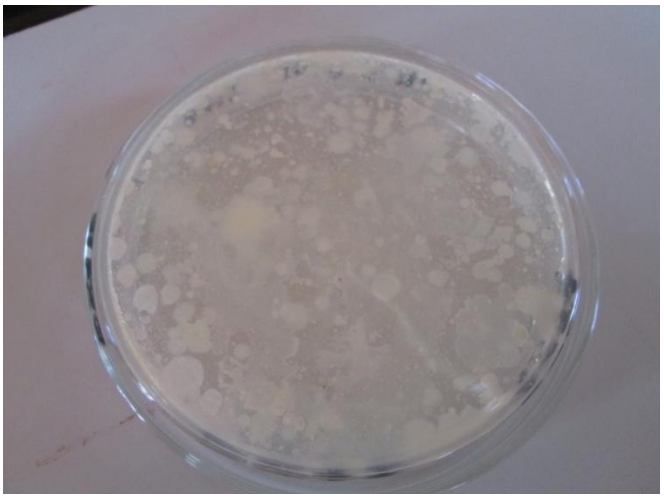


Figure 3 : Dénombrement de FAMT sur gélose PCA exprimé en UFC/g

La FAMT est observée dans tous les échantillons des sites d'échantillonnages avec un taux allant de $2{,}2.10^6$ UFC/g d'huître à 5.10^6, valeur la plus élevée pour le site H1. Notons que ces valeurs sont strictement supérieures aux critères de références.



Source : auteur

Figure 4 : Colonies de la Flore aérobie mésophile totale sur milieu PCA

II.2 Les germes indicateurs de contamination fécale(ICF) :*E.coli*, *E.coli* β-glucuronidase positive 44°C, CT, CF.

Après le temps d'incubation approprié, les colonies caractéristiques ont été comptées :

- Concernant les Coliformes, après incubation à 30°C pour les Coliformes totaux et 44°C pour les Coliformes fécaux, les colonies caractéristiques de couleur rouge foncé ou rouge violacé et parfois entourée d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile ont été comptées.
- Après incubation à 44°C, les colonies caractéristiques d'*Escherichia coli* de couleur vert noirâtre à reflets métalliques ont été comptées.
- Après incubation à 44°C, les colonies caractéristiques *d'Escherichia coli* β-glucuronidase positive de couleur bleue ont été comptées.

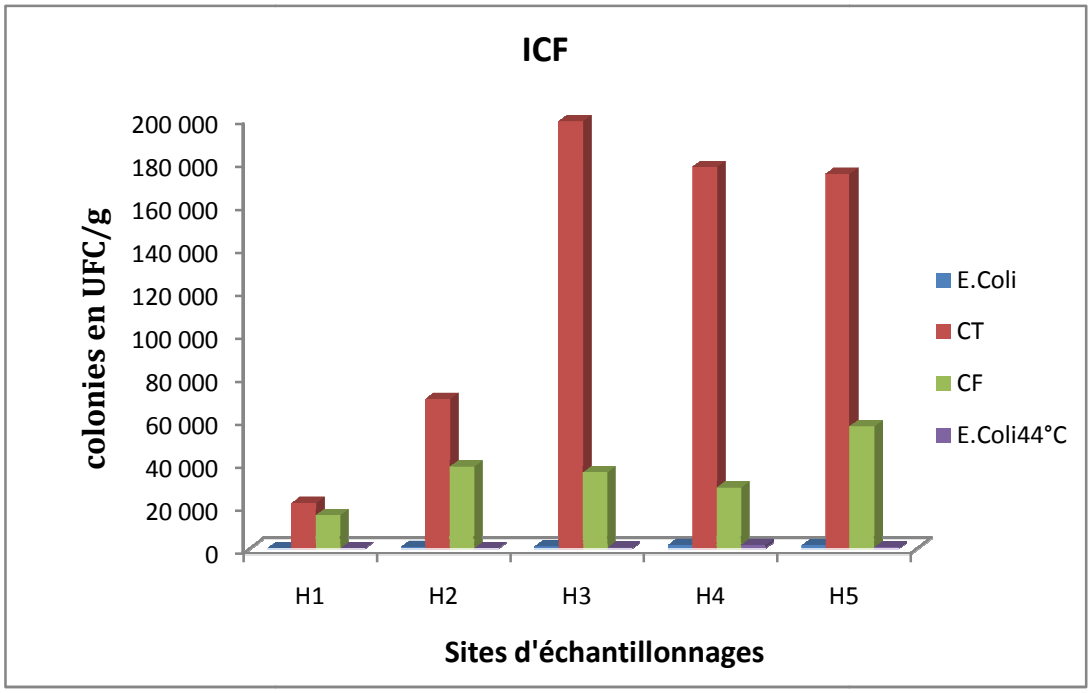


Figure 5 : Dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale

En comparant le nombre des Coliformes totaux par site d'échantillonnage, les échantillons provenant des deux grossistes présentent un nombre inférieur ($2{,}1.10^4$ et $4{,}9.10^4$) à ceux provenant des vendeurs ; les huîtres prélevées chez le vendeur d'Analakely présentent le taux le plus élevé $2{,}9.10^5$ UFC/g.

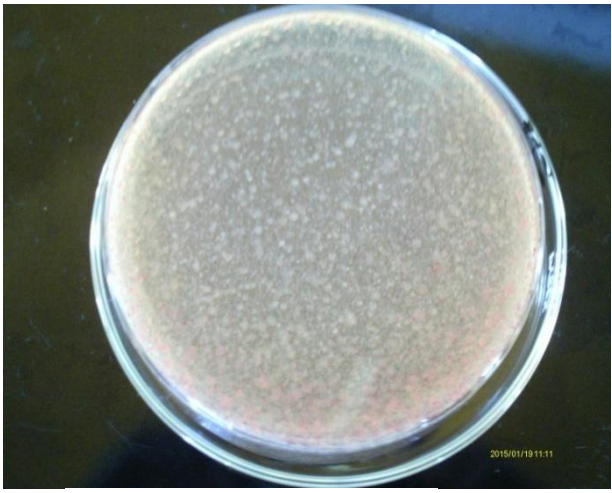
Les nombres des Coliformes fécaux sont de $1,5.10^4$ et $3,8.10^4$ pour H1 et H2 c'est-à-dire les sites d'échantillonnages chez les grossistes de Petite vitesse et d'Antohomadinika. Ils varient entre $2,8.10^4$ et $5,6.10^4$ pour les trois sites d'échantillonnages chez les vendeurs. Toutefois, les résultats sont supérieurs aux critères de référence.

Tous les échantillons ont révélé un taux élevé d'*E.coli* β-glucuronidase positive 44°C supérieur aux critères de référence. Il varie de 10^2 à $5,1.10^2$ UFC/g d'huîtres.

D'après les valeurs de dénombrement, les échantillons du site H4 c'est-à-dire du vendeur Mahamasina sont les plus contaminés par *E.coli* avec un taux de $1,6.10^3$. Toutefois, même pour le plus faible taux $1,4.10^2$ pour le site H1, les critères de référence ne sont pas toujours respectés.

Source : auteur

Figure 6 : Colonies de Coliformes fécaux sur milieu VRBL



Source : auteur

Figure 7 : Colonies de Coliformes totaux sur milieu VRBL

Source : auteur

Figure 8 : Colonies d'*Escherichia coli* sur milieu EMB

II.3 Germe indicateur de contamination humaine(ICH) : Staphylocoques à coagulase positif 37°C.

Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies caractéristiques de Staphylocoques de couleur noire sont entourées d'un halo à la fois composé de zone claire et opaque sur la gélose BP.

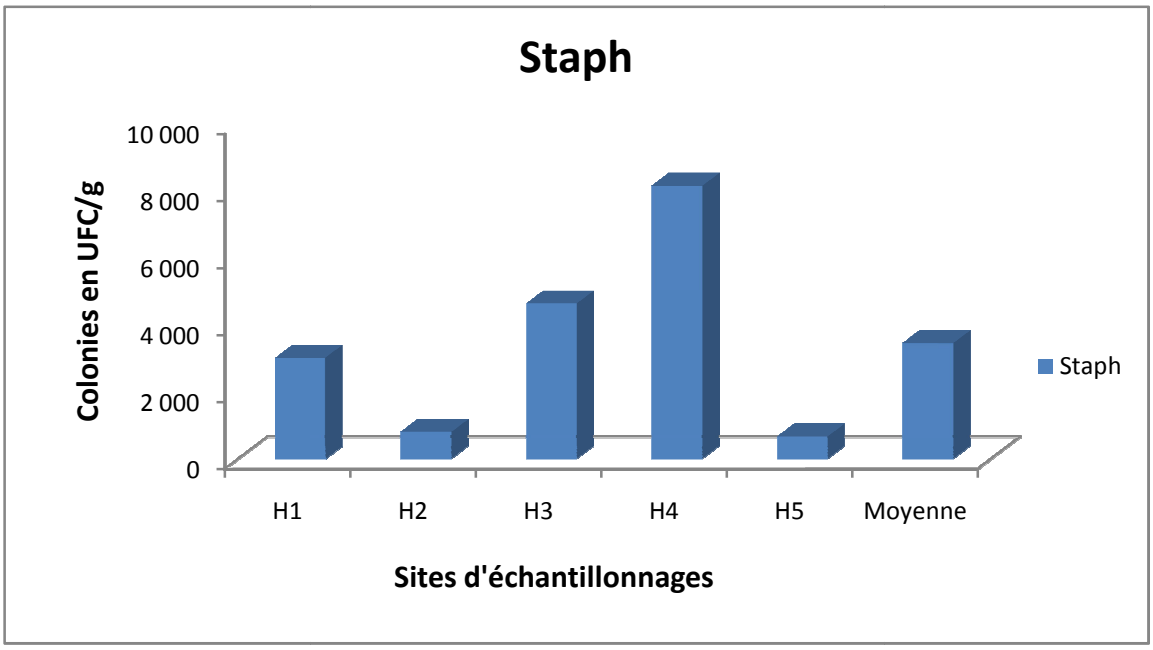


Figure 9 : **Dénombrement des Staphylocoques à coagulase positif 37°C sur milieu BP**

Tous les sites d'échantillonnages ont présenté des taux variant de $6{,}7.10^2$ à $8{,}1.10^3$ UFC/g de l'huître, ce qui est strictement supérieur aux critères de référence.

II.4 Germes pathogènes : *Vibrio spp* et *Salmonella*

Les analyses effectuées concernant la recherche des *Vibrio* spp ont donné des résultats positifs pour tous les sites d'échantillonnages. Après 24h d'incubation, les colonies jaunes lisses aplaties ont été observées. Pourtant, aucune *Salmonella* n'a été isolée dans tous les sites d'échantillonnages.

DISCUSSIONS

La propreté des vendeurs joue un rôle majeur dans la salubrité de l'huître vendue dans la rue. En effet, les vendeurs ne respectent pas les règles d'hygiène et contaminent les produits de différentes manières : par leurs mains sales, leurs habits, les plateaux de vente, les divers matériels de coupe, ainsi que l'utilisation des eaux de lavage souvent impropre. Les huîtres non vendus sont souvent stockés dans des endroits malpropres, ce qui favorise la contamination et le développement des microorganismes.

Le dénombrement des Coliformes totaux dans les huîtres est de qualité insatisfaisante pour tous les sites d'échantillonnages avec une moyenne de $1{,}2.10^5$ UFC/g contre 1.10 UFC/g.

La présence des coliformes fécaux dans les huîtres témoignent une contamination d'origine fécale. En effet, l'analyse des huîtres a donné de qualité insatisfaisante avec une moyenne de $9{,}8.10^4$ UFC/g contre 1.10 UFC/g ; ceci signifie que l'environnement est insalubre et contaminé par des matières fécales. Une étude réalisée par M.DRAME(1994) a montré aussi des résultats insatisfaisants

La concentration moyenne en *E.coli* et *E.coli* glucuronidase positive 44°C sont $9{,}7.10^2$ UFC/g et $5{,}5.10^2$ UFC/g contre 1.10 UFC/g, en effet les huîtres sont jugées insatisfaisants, *E.coli* est considérée comme meilleur indicateur d'une contamination du milieu aquatique par du matériel fécal humain ou d'animaux à sang chaud. La toxi-infection due aux *E.coli* se manifeste sous forme d'une diarrhée banale non sanglante, mais peuvent évoluer vers un syndrome hémolytique et urémique lorsqu'il s'agit de la souche O157:H7 [S.OULKHEIR].

La présence des FAMT dans les échantillons d'huîtres sont insatisfaisants en comparant au critère de référence avec une moyenne de $2{,}9.10^6$ UFC/g contre 1.10^5 UFC/g, la présence des FAMT indique la mauvaise qualité d'hygiène des vendeurs et le non respect des conditions de stockage.

Les résultats lors du dénombrement des Staphylocoques à coagulase positif 37°C dans les échantillons d'huîtres est de qualité insatisfaisant avec une moyenne $3{,}4.10^3$ UFC/g contre 1.10^2 UFC/g [DRAME M, 1994]. *Staphylococcus aureus* est un germe pathogène mais aussi un indicateur d'hygiène, en particulier en cas d'intervention manuelle (tri, manipulation des produits traités artisanalement) [JOUVE, 1993].

Les colonies jaune lisse aplaties observées après 24H d'incubation sont celles de *Vibrio cholerae*, qui est l'agent étiologique du choléra ; il est caractérisé par une toxi-infection brutale avec diarrhées profuses accompagnées de vomissements qui entraînent une déshydratation importante. La maladie présente tous les degrés de gravité de la forme sérieuse qui conduit à la mort du malade jusqu'à la simple diarrhée ou la forme asymptomatique chez les porteurs sains. Le taux de mortalité peut atteindre 9% en Afrique. [LAURENCE M, 2002].

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La réalisation de la présente étude nous a permis de nous familiariser aux différentes techniques d'analyse microbiologique surtout le contrôle qualité des denrées alimentaires.

L'huître est un aliment nutritionnel pour les hommes vu ses apports nutritifs exceptionnels. Malheureusement, les huîtres comme tous les autres bivalves véhiculent plus facilement les germes pathogènes de l'environnement marin. De ce fait sa qualité hygiénique est insatisfaisante, et les germes pathogènes comme *E.coli,* coliformes fécaux, Staphylocoques, *Vibrio cholerae* sont identifiées durant les analyses et leur taux est strictement supérieur aux critères de référence. Ces germes sont responsables des maladies graves et qui peuvent être fatale comme la TIA, intoxication alimentaire, la gastro-entérite, le choléra.

Comme perspectives, et pour compléter notre étude, il serait intéressant à l'avenir de:

- Sensibiliser et former les vendeurs quant aux règles d'hygiène dans l'alimentation de rue.
- Mettre en garde les consommateurs sur la consommation excessive de l'huître
- sensibiliser les producteurs d'améliorer l'environnement marin des zones productions.
- instaurer un système de production moderne comme l'ostréiculture.
- Appliquer le système HACCP qui a pour but d'apporter toutes les garanties quant au respect des règles d'hygiène, de l'autocontrôle efficace et régulier au niveau de la préparation et de la manipulation des aliments de rue de façon à assurer la sécurité sanitaire des produits et la santé des consommateurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- **ABDELMAJID S**. Les Systèmes Agroalimentaires Localisés face à l'insécurité alimentaire : le cas du Système Oléicole dans l'Espace de Saïs-Meknès au Maroc. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Grenoble. 2011 : 577 p.

2- **AFNOR.** Microbiologie alimentaire. Directives générale pour le dénombrement des Staphylococcus aureus. Méthodes par comptage des colonies. 1989 : 253p.

3- **AFNOR.** Microbiologie alimentaire. Directives générale pour les examens microbiologiques. 1988 : 356p.

4- **AFNOR(1989).** Microbiologie alimentaire. Dénombrement des microorganismes par comptage de colonies obtenues à 30°C- Méthodes de routines. Paris : 52p

5- **AFNOR (1986).** Contrôle microbiologique en agroalimentaire. Paris : 375p.

6- **AFNOR (1987).** Echantillonnage et contrôle en agroalimentaire. Paris : 545p.

7- **AFNOR (1988).** Contrôle qualité des produits alimentaires : Analyses sensorielles. 222p.

8- **AMINA C.** Prévalence et caractérisation de souches d*'Escherichia coli* o157 productrices de shigatoxines isolées de denrées alimentaires d'origine animale en Belgique et en Algérie. Université de Liège faculté de médecine vétérinaire, département des sciences des denrées alimentaires. 2007 : 107p.

9- **ANDRIANIRINAMANANA N**. Vérification de la maitrise de la qualité microbiologique des crevettes entières crues congelées selon la méthode des « 5m » cas de la société d'aquaculture LGA du groupe SOCOTA. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome, ESSA, Université d'Antananarivo, Madagascar. 2005 : 93p.

10- **ANONYME .**Directives sur l'application des principes généraux en matière d'hygiène sur la maitrise de vibrio spp dans les fruits de mer. 2010 : 16 p.

11- **ARMAND N.** Contrôle bactériologique pratique des denrées alimentaires d'origine animales. 1986 : 346 p.

12- **ARLENE A., CECILE B., GRET**. Normes de qualité pour les produits agroalimentaires en Afrique de l'Ouest. France : 2009 : 229p.

13- **BARATAUD D., DOYLE A., GALLAY A., THIOLET M., LE GUYADER S., KHOLI E., VAILLANT V** .Huîtres et toxi-infections alimentaires collectives à norovirus .France : 2002 : 2p.

14- **BONHOMME A.** Les bactéries du genre *vibrio* et la santé publique vétérinaire. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, faculté de médecine de Créteil. 2003 : 109p.

15- **BOURGEOIS L.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA. 1980 : 331 p.

16- **CANET C., N'DIAYE C.** L'alimentation de rue en Afrique. Ghana : 1996 : 13p.

17- **CEDRIC A**. Evaluation de la séroprévalence de *Salmonella* spp dans les plats préparés à base de porc dans les gargotes d'Antananarivo et détermination des facteurs de risque associés. Master BGAE-SCIENCES pour l'environnement spécialité écologie fonctionnelle et développement durable parcours EPSED : Faculté des Sciences Montpellier. 2012 : 58 p.

18- **CHEFTEL J.C.CHEFTEL H**. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Paris : Technique et Documentation-Lavoisier, 1990, Volume 2 : 419p.

19- **CHRISTINE B., PIERRETTE C., PASCAL D., FRANÇOISE P., VEILLETTE L.** Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire. 2009 : 58p.

20- **COHEN N, KARIB H.** Vibrio spp dans les produits de la pêche : risque et prévention. Institut Pasteur Maroc : 2007 : 10p.

21- **DEMANCHE A., BOUCHARD G., DAIGLE P.** Dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans les aliments. Québec : 2013 : 6p.

22- **DENIS CORPET E H.** Ecologie microbienne des aliments, contamination et multiplication des microorganismes : 2014 : 14p

23- **EDBERG., EW RICE., RJ KARLIN ET MJ ALLEN** (2000). *Escherichia coli:* the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106S-116S.

24- **E. JOUZIER**. L'huître : aliment et médicament. Université Victor-Segalen Bordeaux II. 3, 1998, 137, 71-89.

25- **ELMUND GK, MJ ALLEN ET EW RICE** (1999). Comparison of *Escherichia coli*, total coliform and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency. *Water Environ. Res.*, 71: 332-339.

26- **FAO**(2007). Assurer la qualité et la sécurité sanitaire des aliments vendus sur la voie publique. 152p.

27- **FAO** (2007). Les bonnes pratiques d'hygiène dans la préparation et la vente des aliments de rue en Afrique. 176p.

28- **FAO., OMS**. Garantir la sécurité sanitaire et la qualité des aliments: directives pour le renforcement des systèmes nationaux de contrôle alimentaire. 1976 : 80p.

29- **FRANÇOIS B.** Technique de prélèvement des échantillons pour l'analyse microbiologique des aliments et de l'eau. 2013 : 28p.

30- **FROMAN. B**. Le manuelle qualité : outil stratégique d'une démarche qualité, AFNOR, deuxième édition : 1995 : 189p.

31- **GUIRAUD J P**. Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod, 1998 : 652p.

32- **HERNANDEZ J.** Etudes quantitative et qualitative des vibrions halophiles dans les eaux marines et estuariennes du nord-pas de calais, Institut pasteur de l'Lille, service eaux-environnement : 1989 : 52p.

33- **JOUVE J L.** La qualité microbiologique des aliments : maitrise et critères. Paris :

34- **JEAN LOUIS CUQ.** Microbiologie alimentaire. Contrôle microbiologique des aliments,

35- **KOFFI-NEVRY R., GOHOU G**. Hygiène des aliments et développement soutenable : impact du monde invisible (microscopique) sur la réduction de la pauvreté. Université d'Abobo-Adjamé Cote d'Ivoire, CESS Institute Québec. 2012 : 20p.

36- **LE GALL J V.** Valeur nutritionnelle et thérapeutique de l'huitre. 1948 : 80p

37- **LAGRANGE P**. Les toxi-infections alimentaires collectives. 2012 : 7p.

38- **LARPENT J P**. Microbiologie alimentaire : techniques de laboratoires. Paris : Technique et Documentation-Lavoisier, 1997 : 1013p.

39- **LAURENCE M**. Les vibrions pathogènes pour l'homme : le risque associé au milieu marin en France. Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral, département Microbiologie et Phycotoxines, laboratoire Microbiologie. France : 2002 : 48 p.

40- **MALICK D**. Contribution à l'étude de la bactériologique des huitres produites au Sénégal : recherche des germes pathogènes. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Faculté de médicine et de pharmacie de Dakar. 1994 : 88 p.

41- **MARIE-ANNICK COMPS**. La qualité bactériologique des coquillages de l'étang de Thau. France : 2000 : 30p.

42- **NADINE N., DIDIER NICOL., ALAIN KHEMI LI., BERNADETTE .** Système de management de la sécurité des aliments. Présentation de la norme ISO2200. 152p

43- **NELSON LOURENÇO**. Toxi-infection alimentaires collectives. 2003 : 10p.

44- **OMS (2001)**. Salubrité des aliments. Genève : 75p.

45- **PLUSQUELLEC A., CORRE S., JACQ E., BEUCHER M., LEGAL Y**. Adaptation d'une technique en milieu gélosé au contrôle bactériologique des coquillages. Institut universitaire de technologie, laboratoire de biologie marine. France, 1995 : 11-20p.

46- **RAKOTONDRAZAKA V T**. Evaluation de la qualité hygiénique d'un aliment de rue consommé dans la ville d'Antananarivo et périphéries : cas du « koba ravina ». DEA en Sciences de la vie. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo : novembre : 56p.

47- **RANAIVOARIMANANA L R**. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique d'un aliment de rue dans la ville de talatan'ny volonondry (Madagascar) : cas du koba ravina. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Faculté de médicine, de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie Dakar. 2006 : 100p.

48- **RAFENOHARISOA M**. Toxi-infections alimentaires collectives à Madagascar janvier 2009 - juin 2011. Direction de la veille sanitaire et de la surveillance épidémiologique. 2011 : 25p. 17p.

49- **RASOLOFONIRINA N.** ; 1989 ; Les bactéries pathogènes rencontrées dans les maladies d'origine alimentaire; Arch.Inst. Pasteur de Madagascar ; 56(1) : 81-91 p.

50- **RAKOTOMIRAHO N., CARAT A., NAZARIES D.** L'hygiène de gargote. Antananarivo : 2008 : 13p.

51- **RAFITOANDRIANARISOA M**. Etude de la qualité sanitaire et nutritionnelle d'un aliment de rue cas du « koba ravina » dans la commune de Talata Ivolonondry. Mémoire en vue de l'obtention du CAPEN, Ecole Normale Supérieure, Université d'Antananarivo. 2012 : 76p.

52- **RANDRIANARISON R.** "Contribution à l'étude de l'alimentation de rue dans le quartier d'Andravoahangy (Antananarivo-ville/Madagascar)". Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences. Mémoire de D.E.A. 2001 : 79p.

53- **RAVAONINDRINA N.** ***et al*** (1999) "Qualité bactériologique d'un aliment de rue commercialisé dans la ville d'Antananarivo : Cas des glaces et crèmes glacées". *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar* ; 65 : 39-40.

54- **RIVIERE J**. Cours de microbiologie. Paris : Institut national agronomique : 1985 : 70p.

55- **SUBIRAT M.** Amélioration de la qualité hygiénique du godrogodro et prolongement de la date limite de conservation. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar. 2014 : 56p.

56- **SCRIBAN R**. (1982) "Biotechnologie". Paris : Technique et documentation-Lavoisier ; 589p.

57- **SINGLETON P., DUSART J**. (1994) "Bactériologie". Paris : Masson ; 247p.

58- **SARTER G**. Organisation institutionnelle du contrôle de la qualité sanitaire des denrées alimentaires à Madagascar. 2008 : 91p.

59- **TRAORE S**. Risques de contraction des affections à *vibrio* sp et à *paragonimus* sp lies à la consommation des crabes et des crevettes vendus sur les marches d'Abidjan et de Dabou. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences et Technologies des Aliments de l'Université Nangui Abrogoua, Spécialité : Microbiologie et Sécurité alimentaire. 2013 : 168 p.

ANNEXES

ANNEXE 1

FICHE D'ENQUETE CHEZ LES GROSSISTES DE L'HUITRE

Lieu : /_____ /

Nom du vendeur : /_____ /

RENSEIGNEMENTS SUR LE VENDEUR

Date de l'interrogatoire : /____/____/____/

Heure de l'interrogatoire : /___/___/ heures /___/___/ mn

Jugement de l'enquêteur sur la propreté du vendeur :

a) Bon ☐ b) Moyen ☐ c) Mauvais ☐

Quel est le montant moyen ?

Quel est le nombre moyen des vendeurs qui achètent par jour ?

D'où viennent les huîtres ?

Le transport se fait avec une voiture frigorifique ? Oui☐ Non ☐

Quel est la quantité de l'huître arrivée chez les grossistes ?

FICHE D'ENQUETE CHEZ LES VENDEUR DE L'HUITRE

Lieu: /_____/

Nom du vendeur : /_____/

RENSEIGNEMENTS SUR LE VENDEUR

1. Code vendeur : /___/___/
2. Numéro : /___/
3. Date de l'interrogatoire : /____/____/____/
4. Heure de l'interrogatoire : /___/___/ heures /___/___/ mn
5. Catégorie de vendeur :

a) Mobile ☐ b) Fixe ☐

6. Jugement de l'enquêteur sur la propreté du vendeur :

a) Bon ☐ b) Moyen ☐ c) Mauvais ☐

7. Jugement de l'enquêteur sur la propreté du matériel de coupe, de l'aiguiseur et de l'étal :

a) Bon ☐ b) Moyen ☐ c) Mauvais ☐

8. La vente est-elle faite dans une vitrine de protection ?

a) Oui ☐ b) Non ☐

9. Quel est le montant moyen par achat ?

a) 100 Ar ☐ b) 200Ar ☐ c) Plus de 200 Ar ☐

10. Quel est le nombre moyen des acheteurs par jour ?

a) entre 40-50 ☐ b) entre 50-60 ☐ c) 60 et plus ☐

11. Est-il fréquent qu'il existe des restes de vente ?

a) Oui ☐ b) Non ☐

12. Est ce que ces restes représentent en moyenne de l'huître initial?

a)1/2 ☐ b) 1/3 ☐ c) ¼ ☐

13. Devenir des aliments non vendus :

a) détruits ☐ b) vendus le lendemain ☐

c) Consommés par le vendeur et sa famille ☐ d) Autres précisez : /_____/

14. Quel est son ancienneté dans la profession ? /___/___/ ans /___/___/ mois
15. Age du vendeur: /___/___/
16. Sexe: M ☐ F ☐
17. Le vendeur est-il membre d'une association professionnelle de vendeur ?

a) Oui ☐ b) Non ☐

18. Le vendeur a-t-il une autorisation administrative de vente ?

a) Oui ☐ b) Non ☐

19. Existe-t-il un point de distribution d'eau potable à proximité ?

a) Oui ☐ b) Non ☐

20. Le vendeur dispose t-il d'une poubelle ?

a) Oui ☐ b) Non ☐

21. Lieu de travail :

a) Marché ☐ b) Station de bus ☐ c) Etablissements administratifs ☐

d) Ecoles/universités ☐ e) Petite ruelle ☐ f) Autres précisez:/____ ☐

ANNEXE 2

➢ GELOSE VRBL

Composition	g/L
Peptone	**7**
Yeast Extract	**3**
Bile Salts No.3	**1,5**
Lactose	**10**
Sodium chloride	**5**
Neutral Red	**0,03**
Crystal violet	**0,002**
Agar	**15**
pH(25°C)= 7,4±0,2	

Préparation :

Suspendre 41,5g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée froide. Chauffer et porter à l'ébullition sous agitation jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver, refroidir à 44-47°C.

➢ GELOSE TBX

Composition	g/L
Tryptone	**20**
Bile salts n°3	**1,5**
Agar	**14**
X-Guc	**mg 75**
pH (25°C)= 7,2 ± 0,2g	

Préparation :

Ajouter 35,6 de poudre à 1000ml d'eau distillée froide. Chauffer jusqu'à l'ébullition et dissolution complète. Distribuer puis autoclaver à 121°C pendant 15 min. Refroidir à 44-47°C.

- **GELOSE EMB**

Composition	g/L
Peptone	**10**
Bleu de méthylène	**0,065**
Eosine	**0,4**
Lactose	**10**
Phosphate dipotassique	**2**
Agar agar bactériologique	**15**
pH (25°C)= 6,8+/−0,2	

Préparation :

Ajouter 34,5 g de poudre à 1000 ml d'eau distillée stérile froide, homogénéiser pendant 5min. Chauffer jusqu'à ébullition et dissolution complète. Distribuer puis autoclaver à 121°C pendant 15 min. Refroidir à 44-47°C.

- **GELOSE PCA**

Composition	g/L
Tryptone	**5**
Extrait autolytique de levure	**25**
Glucose	**1**
Agar agar bactériologique	**13**
pH (25°C)= 7.0+/−0,2	

Préparation :

Mettre en suspension 20.5g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter à ébullition lentement en agitant jusqu'à dissolution complète. Repartir en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Tenir en flacon fermé entre +2 et 30°C.

- **GELOSE BAIRD-PARKER**

Composition	g/950 ml
Tryptone	**10**
Extrait de viande	**5**
Extrait autolytique de levure	**1**
Pyruvate de sodium	**10**
Glycine	**12**
Chlorure de lithium	**5**
Agar Agar bactériologique	**15**
pH (25°C)= 7,2±0,2	

Préparation :

Mettre en suspension 58g de milieu déshydraté dans 950ml d'eau distillée ou déminéralisée. Porter à l'ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15min.

- **GELOSE TCBS**

Composition	g/L
Polypeptone	**10**
Extrait autolytique de levure	**5**
Saccharose	**20**
Bile de bœuf bactériologique	**5**
Cholate de sodium	**3**
Citrate de sodium	**10**
Thiosulfate de sodium	**10**
Chlorure de sodium	**10**
Citrate ferrique ammoniacal	**1**
Bleu de bromothymol	**0,04**
Bleu de thymol	**0,04**
Agar agar bactériologique	**14**
pH (25°C)= 8,6+/−0,2	

Préparation :

Mettre en suspension 88,1 de milieu déshydrate dans un litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter à l'ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver.

➢ BOUILLON D'ENRICHISSEMENT RVS

Composition distillée	g/L d'eau
Peptone de soja	**4,50**
Chlorure de sodium	**7,20**
Phosphate monopotassique	**1,26**
Phosphate diopotassique	**0,18**
Chlorure de Mg anhydre	**13,4**
Vert malachite oxalate	**0,036**
pH (25°C)= 5,2+/−0,2	

Préparation :

Verser 26,6 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Mélanger soigneusement jusqu'à complète dissolution. Repartir 10 ml par tube. Stériliser à 115°C pendant 15 minutes.

➢ GELOSE HEA

Composition	g/L
Tryptone	**12**
Yeast extract	**3**
Bile salts N.3	**9**
Lactose	**12**
Sucrose	**12**
Salicin	**2**
Sodium chloride	**5**
Sodium thiosulphate	**5**
Ferric ammonium citrate	**1,5**
Brom thymol blue	**0,05**
Acid fuchsin	**0,15**
Agar	**15**
pH (25°C)= 7,6+/−0,2	

Préparation ;

Suspendre 76,6 g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée stérile froide. Chauffer et porter à ébullition sous agitation jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver. Refroidir à 45-50°C, bien mélanger et repartir en boîtes de Pétri stériles.

Titre : **ETUDE DE LA QUALITE HYGIENIQUE ET BACTERIOLOGIQUE D'UN ALIMENT DE RUE CONSOMME DANS LA VILLE D'ANTANANARIVO CAS DES HUITRES : « *Ostrea margaritacea* ».**

Auteur : **ANDRIANTELOMANANA Hoby Nalisoa**

Encadreur : **Professeur ANDRIANARISOA Blandine**

RESUME

L'huître possède une valeur nutritionnelle très intéressante grâce à ses différents constituants : glucides, protéines, lipides, sels minéraux et vitamines. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la qualité hygiénique de ce fruit de mer pour que les consommateurs consomment des aliments nutritifs et sains. L'échantillonnage de l'huître a été fait auprès de deux(2) grossistes et trois(3) vendeurs dans la ville d'Antananarivo. Des enquêtes ont été menées auprès de ces vendeurs.

L'évaluation microbiologique a porté sur le dénombrement et la recherche de 8 germes : flore aérobie mésophile totale(FAMT), Coliformes totaux(CT), Coliformes fécaux(CF), *Escherichia coli* (E. coli), *Escherichia coli* β-glucuronidase positive 44°C, Staphylocoque à coagulase positif 37°C, *Vibrio spp*, *Salmonella*.

Une analyse de l'huître a été effectuée et a révélé que la qualité microbiologique de ce dernier est insatisfaisante. Les concentrations des germes recherchés comme les FAMT ($2{,}9.10^6$ UFC/g), les CT ($1{,}2.10^5$ UFC/g), les CF ($9{,}8.10^4$ UFC/g), les *E.coli* ($9{,}7.10^2$ UFC/g), les *E.coli* glucuronidase 44°C positive ($5{,}5.10^2$ UFC/g), les Staphylocoques à coagulase positif 37°C ($3{,}4.10^3$ UFC/g) et *Vibrio Cholerae* ont dépassé largement les critères microbiologiques de référence. *Salmonella* n'a été retrouvée dans aucun échantillon pendant les recherches effectuées. De ce fait l'huître est une source d'intoxication alimentaire, TIA, gastro-entérite, choléra qui sont des maladies d'origine alimentaire graves et fatales.

Mots clés : TIA, aliment de rue, huître, qualité hygiénique, évaluation microbiologique, Vibrio cholerae,

Title: **STUDIE OF THE HYGIENIC AND BACTERIOLOGICAL QUALITY OF A FOOD OF STREET CONSUMED IN THE CITY OF ANTANANARIVO THOSE OF THE OYSTERS: " Ostrea margaritacea ".**

Author: **ANDRIANTELOMANANA Hoby Nalisoa**

Encadreur : **Professeur ANDRIANARISOA Blandine**

ABSTRACT

The oyster possesses a very interesting nutritional value thanks to its various constituents: carbohydrates, proteins, lipids, mineral salts and vitamins. The main objective of this work was to estimate the hygienic quality of this seafood so that the consumers consume nourishing and healthy food. The sampling of the oyster was made with two (2) wholesalers and three (3) sellers in the city of Antananarivo. Inquiries were led with these sellers.

The microbiological evaluation related to the enumeration and the search for 8 germs: Aerobic flora mésophile total (FAMT), Coliformes totals (CT), Coliformes fecal (CF), *Escherichia coli* (E. coli), *positive Escherichia coli* β-glucuronidase 44°C, positive Staphilococcus with coagulase 37°C*, Vibrio spp, Salmonella.*

An analysis of oyster was carried out and revealed that the microbiological quality of this last is unsatisfactory. Concentrations of the germs searched like the FAMT ($2{,}9.10^6$ UFC/g), the CT ($1{,}2.10^5$ UFC/g), the CF ($9{,}8.10^4$ UFC/g), *E.coli* ($9{,}7.10^2$ UFC/g), *E.coli* glucuronidase 44°C positive ($5{,}5.10^2$ UFC/g), the Staphilococca with coagulase positive 37°C ($3{,}4.10^3$ UFC/g) and *Vibrio Cholerae* largely exceeded the microbiological criteria of reference. *Salmonella* was found in no sample during research carried out. This made oyster is a source of food poisoning, TIA, gastro-enteritis, cholera which are diseases of food origin engraves and fatal.

Keywords: TIA, food of street, oyster, hygienic quality, microbiological evaluation, Vibrio cholerae.