

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DÉPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie-Ecologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement: Santé, Eau et Environnement

Thème : Isolement et Identification des bactéries provenant du carassin commun *Carassius carassius* peuplant les eaux du canal Messida, et étude de leurs résistances aux antibiotiques

Présenté par :

AOUADI Zahia

DALI Soumia

REZIG Sara

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme MESSIAD R.

(M.A.A. Université de Guelma)

Examinatrice: Mme AMRI S.

(M.A.A. Université de Guelma)

Encadreur: Mme BENHALIMA L.

(M.A.A. Université de Guelma)

Juin 2015

Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à **Dieu** le tout puissant qui nous a donné le courage et la force pour mener à ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier **Mme MESSIAD R.** Maître assistante au Département de biologie à l'Université de Guelma pour avoir exprimé sa entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier **Mme AMRI S.** Maître assistante au Département de biologie à l'Université de Guelma pour avoir exprimé sa entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements et nos respects vont à notre encadreur **Mme BENHALIMA L.**, qui nous a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Nous la remercions de tout cœur pour sa patience et sa confiance qu'elle nous a toujours accordée durant ces mois. Nous la remercions également pour sa disponibilité, ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements qui nous ont indiscutablement permis d'évoluer.*

Nos remerciements vont également à tous les professeurs et les enseignants qui nous ont beaucoup encouragé et soutenu depuis le début de nos premier cycle d'étude jusqu'à la fin de cinquième année universitaire.

*Nos sincères gratitudes vont également à tous nos collègues et amis (es) de la promotion
2014-2015*

A ceux qui nous contribués de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Sara, Soumia et Zahia

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des schémas

Introduction

Chapitre I : Les poissons des eaux de surface et danger abiotiques et biologiques

I. Les poissons des eaux de surface.....	1
1. Milieu de vie.....	1
2. Diversité ichtyologique.....	1
3. Les facteurs déterminant la répartition des espèces des poissons.....	3
II. Les dangers abiotiques et biologiques.....	5
1. Dangers abiotiques.....	5
2. Dangers biologiques.....	7

Chapitre II : Contamination microbiologique des poissons et risques infectieux

I. Contamination microbiologique.....	9
II. Les risques infectieux.....	9
1. Altération.....	9
2. Les maladies infectieuses des poissons.....	11
2.1. les maladies digestives.....	11
2.2. les atteintes cutanées.....	13
2.3. les maladies respiratoires.....	17

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1. Présentation de la zone d'étude.....	20
1.1. Description du canal Messida.....	20
2. Présentation de l'espèce étudiée : le carassin commun.....	24
2.1. Identification, biologie et morphologie du modèle biologique.....	24
2.2. Position systématique de carassin <i>Carassius carassius</i>	26
2.3. Intérêt.....	26
3. Stratégie d'échantillonnage.....	26

3.1. La pêche du carassin commun.....	26
3.2. Fréquence et transport des échantillons.....	29
4. Méthode d'analyse.....	29
4.1. Examen macroscopique des poissons.....	29
4.2. Détermination du poids, sexe des poissons et le pH des différentes parties du corps.....	30
5. Analyse bactériologique.....	30
5.1. Méthode de collecte des différentes parties de corps du poisson.....	31
5.2. Isolement et identification des bactéries présentes dans les différentes parties de corps du poisson.....	33
5.2.1. Entérobactéries.....	33
5.2.2. Staphylocoques.....	44
5.2.3. Les streptocoques fécaux.....	48
5.2.4. Vibrions cholériques.....	52
5.2.5. <i>Pseudomonas</i>	55
5.2.6. <i>Aeromonas</i>	58
6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	60

Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Résultats.....	63
1. Résultats de l'examen macroscopique des carassins étudiés.....	63
2. Résultats de détermination du sexe et du poids des carassins étudiés	63
3. Résultats représentant les valeurs de pH des différentes parties de corps des carassins étudiés.....	64
4. Résultats d'isolement et d'identification de la flore bactérienne.....	65
5. Résultats de l'antibiogramme.....	88
II. Discussion.....	91
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Principales abréviations utilisées

PNEK : Parc National d'El Kala

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

VF : Viande-Foie

SS : *Salmonella-Shigella*

NR : Nitrate réductase

API : Analyse Prophylactic Index

TSI : Triple SugarIron

VP : Voges Proskawer

TDA : Tryptophane décarboxylase

ONPG : Ortho-Nitrophényle-B-D-Galactosidase

EPA : Eau Peptonée Alcaline

GNAB : Gélose Nutritive Alcaline et Biliée

GN : Gélose Nutritive

UV : Ultra Violet

MH : Mueller Hinton

IND : Indole

RM : Rouge de méthyle

NIT : Nitrate

S : Sensible

R : Résistance

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

µg : microgramme

D/C : Double Concentration

S/C : Simple Concentration

pH : potentiel Hydrogène

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	N° de Page
01	Liste des maladies d'origine bactérienne rencontrées ou pouvant apparaître chez les poissons.	16
02	les principaux caractères du canal Messida.	22
03	Code pathologique.	29
04	Aspects culturels des entérobactéries sur les milieux sélectifs.	36
05	Tests biochimiques utilisés pour l'identification des entérobactéries.	41
06	Tableau d'identification des staphylocoques.	47
07	Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.	62
08	Les valeurs de prévalence des lésions externes des carassins <i>Carassius carassius</i> peuplant le canal Messida.	63
09	Résultats de détermination du sexe et du poids des carassins <i>Carassius carassius</i> étudiés.	64
10	Valeurs de pH des parties étudiées.	64
11	Aspect macroscopique et microscopique des colonies des entérobactéries isolées du carassin commun peuplant le canal Messida.	65
12	Résultats de l'identification des entérobactéries.	70
13	les résultats de la recherche des enzymes respiratoires des entérobactéries isolées des carassins <i>Carassius carassius</i> peuplant le canal Messida.	71
14	Résultats des tests biochimiques classiques des entérobactéries isolées des carassins <i>Carassius carassius</i> peuplant le canal Messida.	72
15	Résultats de l'identification des souches bactériennes poussées sur la gélose Chapman.	81
16	Aspect macroscopique et microscopique des colonies poussées sur la gélose GN après culture sur Eva-Litsky.	83
17	Résultats de l'identification des souches bactériennes poussées sur la gélose columbia au sang.	85
18	les bactéries identifiées à partir des carassins <i>Carassius carassius</i> peuplant le canal Messida.	87
19	Résultats de l'antibiogramme.	88

Liste des figures

N° de Figure	Titre	N° de Page
01	Carte de localisation du site d'étude.	21
02	Le carassin <i>Carassius carassius</i> .	25
03	Vues générale des points de prélèvements.	28
04	Détermination du poids des poissons étudiés.	30
05	(a) : Prélèvement et ;(b) : préparation de la solution mère de mucus.	31
06	Méthode de prélèvement et de préparation de la solution mère des branchies.	32
07	Méthode de prélèvement et de préparation de la solution mère de la chair.	32
08	Colonies marron sur la gélose Hektoen.	67
09	Colonies orangées sur la gélose Hektoen.	67
10	Colonies roses sur la gélose SS.	67
11	Colonies noires sur la gélose SS.	67
12	Colonies vertes à centre noires sur la gélose Hektoen.	68
13	Colonies rouges brique sur la gélose SS.	68
14	Colonies incolores à centre noir sur la gélose SS.	68
15	Colonies incolores sur la gélose SS.	68
16	Colonies rouges sur la gélose Hektoen.	68
17	Colonies roses à centres noirs sur la gélose SS.	68
18	Colonies orangées sur la gélose Hektoen.	69
19	Colonies rouges brique sur la gélose SS.	69
20	Colonies vertes à centres noirs sur la gélose Hektoen.	69
21	Colonies rouges brique sur la gélose SS.	69
22	Colonies blanchâtres sur la gélose Mac Conkey.	69
23	Colonies rouges brique sur la gélose Hektoen.	69
24	Colonies marron sur la gélose Hektoen.	70

Suite de la liste des figures :

25	Colonies incolores sur la gélose SS.	70
26	Résultats de la galerie Biochimique classique pour <i>Proteus mirabilis</i> .	72
27	Résultats de la galerie biochimique classique pour <i>Salmonella</i> spp. (S3).	72
28	Résultats de la galerie biochimique classique pour <i>Pontoea</i> spp. 2.	73
29	Résultats de la galerie biochimique classique pour <i>Citrobacter freundii</i> .	73
30	Résultats de la galerie biochimique classique pour <i>Serratia ficaria</i> .	73
31	Résultats de la galerie biochimique classique pour <i>Escherichia coli</i> 1.	73
532	Profil biochimique d' <i>Enterobacter cloacae</i> .	73
33	Profil biochimique de <i>Pontoea</i> spp.	74
34	Profil biochimique de <i>Citrobacter braakii</i> .	74
35	Profil biochimique de <i>Salmonella choleraesuis</i> spp <i>arizonae</i> .	74
36	Profil biochimique d' <i>Escherichia vulneris</i> .	74
37	Profil biochimique de <i>Hafnia alvei</i> .	74
38	Profil biochimique de <i>Salmonella</i> spp.(Sa1).	74
39	Profil biochimique de <i>Raoultella terrigena</i> .	75
40	Profil biochimique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i> .	75
41	Profil biochimique d' <i>Enterobacter sakazakii</i> .	75
42	Profil biochimique de <i>Salmonella</i> spp. (Sa2).	75
43	Profil biochimique de <i>Serratia odorifera</i> 1.	75
44	Profil biochimique de <i>Kluyvera</i> spp.	75
45	Aspect des colonies de <i>Vibrio fluviatis</i> ;(a) : colonies blanchâtres sur GN à pH = 9, (b): bacille, Gram négatif (×100).	76
46	Profil biochimique de <i>Vibrio fluviatis</i> .	77
47	Aspect des colonies de <i>Vibrio alginolyticus</i> ; (a) colonies vertes sur la gélose Hektoen ; (b): bacille, Gram négatif (×100).	77
48	Profil biochimique de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	77
49	Aspect des colonies de <i>Pseudomonas luteola</i> ;(a) : diffusion du pigment vert sur Cétrimide, (b) : bacille ; Gram négatif (×100).	78

Suite de la liste des figures

50	Profil biochimique de <i>Pseudomonas luteola</i> .	78
51	Aspect des colonies de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , (a) : colonies blanchâtres sur GN à pH = 9, (b) : bacille ; Gram négatif (×100).	79
52	Profil biochimique de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	79
53	Aspect des colonies de <i>Pasteurella</i> spp. (a) : colonies blanchâtres sur Cétrimide, (b) : bacille ; Gram négatif (×100).	79
54	Profil biochimique de <i>Pasteurella</i> spp.	80
55	Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> , (a) : colonies jaunes sur Chapman avec virage de couleur, (b):Cocci en amas à Gram positif (×100).	81
56	Aspect des colonies de <i>Micrococcus</i> spp.,(a) :colonies blanchâtres sur Chapman(b):Cocci, Gram positif (×100).	81
57	Résultat du test Staphylocoagulase.	82
58	Profil biochimique de <i>Staphylococcus aureus</i> .	82
59	Profil biochimique de <i>Micrococcus</i> spp.	82
60	Aspect des colonies poussées sur la gélose GN après culture sur Eva-Litsky.(a) :colonies blanchâtres ;(b):Cocci à Gram positif (×100).	83
61	Profil biochimique d' <i>Enterococcus faecium</i> .	83
62	Aspect des colonies d' <i>Aeromonas hydrophila</i> ;(a) : colonies blanchâtres sur Columbia au sang (b): Bacille ; Gram négatif. (×100).	84
63	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Aeromonas hydrophila</i> (A1).	85
64	Profil biochimique d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (A1).	85
65	Aspect des colonies d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (A4) ; (a) :colonies vertes jaunâtres sur la gélose Hektoen, (b): Bacille ; Gram négatif. (×100).	86
66	Profil biochimique d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (A4).	86
67	Résultat de l'antibiogramme de <i>Micrococcus</i> spp.	89
68	Résultat de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .	89
69	Résultat de l'antibiogramme de <i>Salmonella</i> spp.(S2).	89
70	Résultat de l'antibiogramme de <i>Serratia odorifera</i> 1.	89
71	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Enterococcus faecium</i> .	89
72	Résultat de l'antibiogramme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i> .	89

Suite de la liste des figures

73	Résultat de l'antibiogramme de <i>Pontea</i> spp.2.	90
74	Résultat de l'antibiogramme de <i>Proteus mirabilis</i> .	90
75	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Enterobacter sakazakii</i> .	90
76	Résultat de l'antibiogramme de <i>Raoultella terrigena</i> .	90

Liste des schémas

N° de Schéma	Titre	N° de Page
01	Isolement des Entérobactéries.	35
02	Recherche des Staphylocoques pathogènes.	45
03	Recherche des streptocoques fécaux.	50
04	Recherche des Vibrions cholériques.	54
05	Isolement et identification de <i>Pseudomonas</i> .	57
06	Isolement et identification des <i>Aeromonas</i> .	59

Introduction :

L'eau est considérée comme un milieu biotique occupée et exploitée par une multitude d'organismes vivants : bactéries, champignons, algues, mousses, invertébrés et vertébrés parmi lesquels les poissons qui occupent tout le types d'eau quelles que soient leur température et leur salinité, leur altitude et leur profondeur (Bruslé et Quignard, 2004).

Les poissons peuvent alors servir d'indicateur écologiques (témoins directs des contaminations et des altérations des écosystèmes) de la qualité des eaux (Patrick et Palavage, 1994) que l'homme l'influence par des polluants que ce soit d'origine agricole (nitrates, produits phytosanitaires : herbicides, pesticides, fongicides...), industrielle (métaux lourds, PCB : PolyChloroBiphényles, TBT : tributylétain...) et urbaine (matière organique, phénols...) qui sont responsables d'une dégradation de la qualité des eaux (Bruslé et Quignard, 2004).

Les poissons sont fortement soumis à l'impact de la dégradation de la qualité de l'eau, soit directement en raison de leur sensibilité vis-à-vis de molécules toxiques inductrices de lésions organiques à des doses sublétales et de la mort des poissons à des doses létales (Bruslé et Quignard, 2004), soit indirectement en raison de leur toxicité propre, à cause des modifications physicochimiques de l'eau et des perturbations biotiques qu'ils engendrent (Bruslé et Quignard, 2004). D'autre part, les poissons eux même sont susceptibles d'avoir été exposés à des microorganismes et à des toxines naturelles, qui peuvent s'accumuler dans leur chair. Donc la consommation habituelle et fréquente de ces poissons constitue un risque réel à la santé publique [1].

Face à cette situation, nous avons proposé d'étudier la qualité des poissons (carassins commun) peuplant un écosystème aquatique lacustre (le canal Messida) en identifiant les bactéries présentes dans les différentes parties de leurs corps.

Le canal Messida est un chenal artificiel reliant le lac Tonga (site RAMSAR) à la mer Méditerranée, il constitue un corridor biologique permette aux civelles d'anguilles, et quelques autre espèces de poissons de se déplacer de la mer vers le lac et vice versa (Benhalima et *al.*, 2013).

Les eaux du canal Messida sont destinées à plusieurs activités : l'irrigation, la chasse, la pêche, et même des activités touristiques. Au cours de la période haute eau, le canal Messida constitue une zone de pêche très importante pour les habitants de la région, les

poissons pêchés par des méthodes artisanales sont vendus avec des quantités énormes, sans savoir une idée sur la qualité de cet aliment ni sur la qualité du milieu de vie, et malheureusement, le cours d'eau Messida est l'un des écosystèmes qui est actuellement menacé par les activités humaines ce qui peut constituer une menace considérable pour la faune et la flore de la zone d'étude (Benhalima et *al.*, 2013).

Dans le but de cerner l'état de santé des poissons peuplant les eaux du canal Messida, nous avons effectué une analyse bactériologique des branchies, mucus et la chair d'un poisson très fréquent dans le site d'étude : le carassin commun *Carassius carassius*, en raison de leur capacité de résistance et d'accumulation des polluant du milieu.

Donc les objectifs du présent travail sont:

- ✓ Détermination de la diversité bactérienne des différentes parties de corps du carassin commun peuplant les eaux du canal Messida.
- ✓ L'étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées.
- ✓ L'évaluation des risques environnementaux et humains.

Nous avons organisé notre démarche en quatre chapitres :

- Le premier et le second est purement théorique rassemble d'une part les poissons des eaux de surface et dangers abiotique et biologique et d'autre part la contamination microbiologique des poissons et risques infectieux.
- Le troisième est un chapitre expérimental consacré aux méthodes utilisées pour l'analyse bactériologique et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.
- Enfin, le quatrième chapitre, mentionne les différents résultats obtenus au cours de notre étude sous forme des tableaux et des figures, avec une discussion et une conclusion clôturant le mémoire.

I. Les poissons des eaux de surface :**1. milieu de vie :**

Les eaux de surface proviennent surtout des pluies, et elles sont constituées d'un mélange d'eau de ruissellement et d'eau souterraine. Elles comprennent les eaux des grands cours d'eau, des étangs et des lacs, ainsi que des petits ruisseaux des hauts pays alimentés par des sources et qui recueillent les eaux de ruissellement des bassins versants [10].

Ces eaux constituent un milieu de vie pour plusieurs organismes vivants comme : des insectes, des invertébrés, des vertébrés parmi lesquelles les poissons qui sont des organismes très importants pouvant être des indicateurs écologiques de la qualité de leur écosystèmes aquatiques.

Les poissons ont besoin d'un milieu de vie qui lui permet de se nourrir et de se reproduire, donc la qualité de l'eau joue un rôle important dans l'adaptation et la diversité de ces organismes [11].

Il existe trois catégories de poissons selon les types d'eau :

- Les espèces intolérantes qui dominent les eaux fraîches, claires et bien oxygénées,
- Les espèces tolérantes qui adaptent avec les eaux chaudes, troubles et moins oxygénées,
- Et les espèces intermédiaires qui ont un seuil de tolérance intermédiaire par rapport aux deux autres groupes (Ovidio et Philippart, 2008).

Actuellement une diversité extraordinaire de poissons dans le monde est connue, avec plus de 26.000 espèces. On les trouve dans différents types d'environnements tels que les lacs, les lagunes, les ruisseaux, les rivières, et les fleuves (Mbega, 2013). Depuis longtemps, les poissons des eaux douces constituent un élément socio-économique très important dans plusieurs pays (Poillebauer et Alliod, 2010).

2. Diversité ichtyologique :

Les poissons d'eau douce représentaient 38 pour cent de la production aquacole mondiale en termes de quantité, et 34 pour cent en termes de valeurs en 2003. d'après la FAO, plus de 120 espèces de poissons d'eau douce sont élevées depuis 1950 (FAO, 2008).

Alors que beaucoup de pays ont tendance à se concentrer sur les espèces indigènes, quelque espèces telles que la carpe (*Cyprinus carpio*), le silure (*Aminurus nebulosus*), et le tilapia (*Oreochromis* spp.) ont été à l'origine de la création de secteurs aquacoles que l'on peut qualifier de globaux (Junnig et al., 2011).

L'ichtyofaune des eaux continentales d'Algérie est composée de 67 espèces réparties en 27 familles (6 espèces autochtones et 20 introduites) (Lounaci, 2012). Les Cyprinidés dominent avec 22 espèces (33 %), suivis par les Cichlidés avec 8 espèces (10 %) et les Mugilidés avec 7 espèces. La majorité des espèces signalées sont recensées entre 1842 et 1989. *Aphaniuss aourensis*, est la dernière à avoir été signalée en 2006 par Blanco et al., (2006). Toutefois, la taxonomie de l'ichtyofaune Algérienne reste à ce jour incomplète, notamment en ce qui concerne le genre *Barbus*. Selon Azeroual et al (2000), la diversité décroît d'Ouest en Est où le Maroc est la région de l'Afrique du Nord la plus diversifiée avec 11 espèces, suivi par l'Algérie avec 4 espèces et la Tunisie avec 2 espèces (Chaibi, 2014).

Concernant les espèces introduites on peut distinguer trois grandes étapes d'introduction : la première étape (1858-1924) au cours de laquelle l'Algérie a connu essentiellement l'introduction de la carpe commune (*Cyprinus carpio*), le poisson rouge (*Carassius auratus*), la tanche (*Tincatinca*) et la gambusie (*Gambusia holbrooki*) (Playfair et Le tourneux, 1871 ; Pellegrin, 1921 ; Seurat, 1930).

La deuxième étape (1935-1961) est surtout marquée par de nombreuses introductions de la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et de la truite *macrostigma* (*Salmo trutta macrostigma*) au nord du pays et de *Oreochromis macrochir* et *Tilapia zillii* au Sud (Zouakh et Bouhadad, 2002).

La troisième étape (1985-2002) a été caractérisée d'une part par l'introduction de la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*), la carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpe marbrée (*Aristichthys nobilis*), le sandre (*Sander lucioperca*), le silureglane (*Silurus glanis*), le brochet (*Esox lucius*) et, d'autre part, par l'introduction de *Pseudorasbora parva* (Perdices et Doadrio, 1992 ; Chalabi, 2000 ; Zouakh et Bouhadad, 2002).

La répartition des poissons est fortement influencé par la qualité et la morphologie des cours d'eau, c'est pour cela elles sont considérées comme des excellents indicateurs a longtemps de l'intégrité de l'écosystème entier (poillebauer et alliod, 2010).

3. Les facteurs déterminant la répartition des poissons :

La répartition des poissons ne s'établit pas de manière aléatoire. Elle dépend étroitement des préférences écologiques des espèces. Les conditions environnementales locales telles que la température, la vitesse d'écoulement des eaux et la profondeur, déterminent la répartition des espèces. Ces conditions locales dépendent elles-mêmes de facteurs de contrôle plus globaux comme le climat, la géologie ou la structure du réseau hydrographique. Il en résulte une structuration des peuplements marquée à la fois par des modifications de l'amont vers l'aval et des différenciations régionales (Jérôme et *al.*, 2009).

La diversité des milieux aquatiques offre donc une grande diversité d'habitats ce qui favorise la biodiversité de ces milieux. La qualité de l'eau est un des facteurs les plus importants pour conserver une bonne diversité et une bonne santé des poissons.

3.1. Les facteurs environnementaux :

Les principaux facteurs environnementaux de la biosphère que sont la température, la salinité, la lumière, l'oxygène, l'hydrodynamisme, le substrat, les nutriments et les polluants contrôlent l'écophysiologie des poissons et déterminent leur distribution spatiotemporelle (Bruslé et Quignard, 2004).

Une grande stabilité des habitats d'eau liée à l'hauteur d'eau constitue un facteur important qui conditionnent la richesse spécifique des cours d'eau (Bruslé et Quignard, 2004).

Par contre sous l'effet de phénomènes naturelles ou de perturbations anthropiques le nombre des habitats disponibles étant plus faible à cause de la diminution de l'espace vitale.

3.2. Les Facteurs anthropiques :

L'homme influe sur la répartition des animaux dans le milieu en déversant y des polluants organiques (composés chimiques d'origine anthropiques proviennent des diverses

activités humaines : urbaines, industrielles et agricoles) et des polluants microbiologiques (des bactéries, des virus, des parasites et des champignons proviennent principalement des eaux usées et des activités agricoles)[5], qui sont capable d'introduire des effets biologiques néfastes pour la flore et la faune aquatique (Tronczynski et *al.*,1999).

***Pollution organique :**

Le déversement d'eaux chargées en matières organiques dans une rivière provoque une perturbation sérieuse du milieu avec l'apparition de quatre zones successives dans le sens du courant :

- **en amont du rejet :** une zone où l'eau claire, douce et bien oxygénée montre une population normale de poissons et d'insectes aquatiques (phrygane, éphémère) exigeants en dioxygène.
- **au niveau du rejet :** une zone où l'eau est trouble et colorée avec une population tolérante de poissons et la présence de larves de chironomes.
- **en aval du rejet :** une zone où l'eau est toxique, malodorante et contient des boues flottantes. On y trouve des larves d'insectes peu exigeantes en dioxygène, comme l'éristale, mais plus aucun poisson.
- **plus en aval :** une zone de restauration, avec un retour progressif à la qualité normale de l'eau et du peuplement animal initial.
- Finalement, une pollution organique a des effets sur les eaux courantes car elle provoque un **changement complet du peuplement de la rivière en poissons et en organismes invertébrés**. Ces changements sont liés à la diminution en dioxygène due à la décomposition des matières organiques par des êtres vivants [6].

***La pollution microbiologique :**

Les eaux de surface véhiculent de nombreux microorganismes comme des bactéries, des virus, des protozoaires, des algues (Pierre et *al.* ; 1999).

Toute modification provoquée par un contaminant sur la biologie d'un animal, que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire ou physiologique, peut altérer sa santé ou sa reproduction.

Par conséquent, si l'exposition à ce contaminant est suffisamment importante (par la dose ou la durée d'exposition), elle peut conduire à diminuer l'abondance de l'espèce localement, voire mener à la disparition de la population (Bouchard, 2008).

L'attaque des poissons par des microorganismes pathogènes peut affecter la peau, les branchies et même le tube digestif, et le système nerveux.

Donc la pollution microbiologique est l'une des principales causes de l'apparition de maladies et des problèmes sanitaires voire même de la disparition de plusieurs espèces (Pierre et *al.* ; 1999).

II. Les dangers abiotiques et biologiques :

1. Dangers abiotiques :

• la température :

L'activité métabolique des organismes aquatiques est également accélérée lorsque la température de l'eau s'accroît (Villers et *al.*, 2005).

La température de l'eau influe sur beaucoup d'autres paramètres. C'est en premier lieu le cas pour l'oxygène dissous indispensable à la vie aquatique : Plus la température de l'eau s'élève, plus la quantité d'oxygène dissous diminue. Une température trop élevée des eaux d'une rivière peut donc aboutir à des situations dramatiques de manque d'oxygène dissoute pouvant entraîner : la disparition de certaines espèces, la réduction de l'auto-épuration, l'accumulation de dépôts nauséabonds (odeurs), la croissance accélérée des végétaux [7].

• pH :

Le pH d'une eau naturelle peut varier de 4 à 10 en fonction de la nature acide ou basique des terrains traversés. Des pH faibles (eaux acides) augmentent notamment le risque de présence de métaux sous une forme ionique plus toxique. Des pH élevés augmentent les concentrations d'ammoniac, toxique pour les poissons (Villers et *al.*, 2005).

Dans les deux cas les effets des valeurs extrêmes de pH sont multiples et se traduisent surtout par des lésions de l'épithélium branchiales et des modifications de l'hémoglobine du sang (Bruslé et Quignard, 2004).

• **L'oxygène :**

Le taux de l'oxygène est un paramètre essentiel pour la fonction respiratoire et apparait comme un facteur vital pour tous les poissons (Bruslé et Quignard, 2004).

Son manque peut provoquer la mort de nombreux poissons par asphyxie. Il est la cause d'infirmités, de malformation, de trouble de la croissance et surtout d'affaiblissement, favorisant le développement des bactéries [8].

Par contre, leur excès peut être dû à une végétation aquatique trop importante. Il peut provoquer la maladie gazeuse : des petites bulles de gaz gonflent et crèvent sur la peau. Les poissons sont affaiblis et peuvent mourir de ces lésions ou d'infections [8].

• **Lumière et nutriments :**

Des concentrations de nitrates et de phosphates trop importantes induisent le phénomène d'eutrophisation (étouffement de la vie aquatique). Ces substances sont normalement générées par la minéralisation de la matière organique. Toutefois, présentes en trop grande quantité suite à des rejets intempestifs, elles favorisent la prolifération d'algues et de micro-organismes photosynthétiques qui réduisent la pénétration de la lumière dans les couches d'eaux profondes. Si ces algues et microorganismes photosynthétiques produisent de l'oxygène le jour, ils en consomment la nuit, et ces variations en concentration d'oxygène peuvent être fatales aux poissons. Par ailleurs, la décomposition des algues mortes induit également une consommation d'oxygène. Lorsque l'eau est trop peu oxygénée, les conditions d'anaérobiose risquent également de se traduire par une accumulation de composés ammoniacés et de nitrites susceptibles d'intoxiquer la faune et la flore (Villers et *al.*, 2005).

Remarque : Les nitrates sont impliqués plus dans les perturbations des milieux aquatiques marins que celles des eaux douces dont le phosphore est le principal limitant.

Habituellement, sans apport artificiel, les taux des nitrates et nitrites dans les eaux de surface ne dépassent pas respectivement 10mg/litre et 1mg/litre (Bouhaous et bengharez, 2012).

- **Métaux lourds**

La plupart des métaux lourds sont présents naturellement dans les roches et les sols. L'altération naturelle des roches et des sols peut entraîner la libération de métaux lourds dans les lacs et les rivières (TNO, 2004).

Ils précipitent sous forme de sulfures insolubles ou d'hydroxydes dans les conditions anaérobies qui prévalent dans les eaux-vannes brutes et subissent une baisse de concentration supplémentaire dans les conditions alcalines des bassins alimentés par des rejets, car la solubilité des métaux diminue lorsque le pH augmente. Bien que les poissons absorbent rapidement les métaux présents dans l'eau à travers leurs branchies et ceux associés aux aliments dans leurs viscères, ils sont capables de réguler les concentrations de métaux lourds inorganiques dans leurs tissus musculaires [9].

Mais des concentrations élevées de certains métaux (fer, plomb, cuivre, zinc, etc.), entraînent chez les poissons, une augmentation de la sécrétion de mucus et une destruction de l'épithélium branchial. Il en résulte des difficultés respiratoires allant jusqu'à l'arrêt de la respiration (mort). L'empoisonnement par le plomb provoque en outre de l'anémie [9].

- **Chlore à l'état libre :**

Le chlore à l'état libre est une substance très toxique. Une concentration de 0,1 mg par litre est le plus souvent déjà mortelle. Le chlore attaque les branchies qui s'éclaircissent et qui sont détruites (mort par asphyxie) [9].

- **Phénol et dérivés du phénol :**

Ces composés organiques sont des poisons pour le système nerveux. De plus ils endommagent l'épithélium branchial, l'intestin et le tégument. Par l'intermédiaire de la circulation sanguine, le foie, la musculature et les ovaires sont également atteints. L'empoisonnement par le phénol est d'une importance faible pour l'aquariophile et il est, le plus souvent, incurable [9].

2. Dangers biologiques :

Lorsqu'ils sont présents en excès dans les eaux usées, les boues, les excréta ou les engrais d'origine humaine, les nutriments (principalement de l'azote et du phosphore) peuvent contaminer les eaux de surface et provoquer une eutrophisation. À son tour,

l'eutrophisation des sources d'eau douce peut créer des conditions environnementales favorables au développement de cyanobactéries produisant des toxines. Les toxines libérées par ces cyanobactéries sont susceptibles de provoquer des gastro-entérites, des lésions hépatiques, des troubles du système nerveux central et des irritations cutanées. L'exposition chronique à des toxines cyanobactériennes a été associée à des cancers du foie chez l'animal et peut provoquer des effets similaires chez l'homme (OMS, 2013).

Dans les lacs et les réservoirs, certaines cyanobactéries d'eau douce forment des colonies de cellules (par exemple *Microcystis aeruginosa*), parfois organisées en filaments (comme celles de *Planktothrix agardhi* ou de *P. rubescens*) (Jacquet et al., 2011).

Les poissons et les végétaux accumulent passivement à leur surface des contaminants microbiens. Ils concentrent dans leurs viscères les bactéries, les virus et les protozoaires présents dans l'eau. Dans le cadre de l'aquaculture alimentée par des rejets fécaux humains et animaux (Bétails et oiseaux), ils peuvent concentrer des microorganismes pathogènes pour l'homme car certains d'entre eux sont également présents dans l'eau. Il est rare que des agents pathogènes (à l'exclusion des trématodes) pénètrent dans la chair comestible des poissons (muscles). Cependant, si les poissons sont stressés (par exemple en raison du surpeuplement, de la mauvaise qualité de l'eau ou d'autres conditions), les bactéries et les virus (il n'existe pas de données concernant les protozoaires) sont parfois en mesure de pénétrer dans la chair comestible (OMS, 2013).

Actuellement, le sujet le plus discuté est la présence des bactéries antibiorésistantes dans les milieux de vie des poissons et qui peuvent être transférés par plusieurs mécanismes et être présents chez les poissons. L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission de micro-organismes résistants. L'exposition à un antimicrobien favorise la survie des souches bactériennes résistantes présentes dans une population. La réduction de la pression sélective des antibiotiques est importante pour prévenir l'émergence d'une résistance microbienne et préserver le plus longtemps possible l'efficacité des médicaments disponibles (Sylvie, 2009).

I. Contamination microbiologique :

Les microorganismes se rencontrent sur toutes les surfaces externes (peau et branchies) et dans les intestins du poisson vivant ou fraîchement capturé. La charge microbienne, très variable, est de l'ordre de 10^2 à 10^7 germes/cm² de peau, et de 10^3 à 10^9 germes/gramme de branchies ou d'intestins (Huss, 1988).

Cette grande variabilité reflète l'effet de l'environnement. Ainsi, des charges microbiennes réduites (de 10 à 100 germes/cm² de peau) se rencontrent dans les poissons provenant d'eaux froides et propres, alors que des charges élevées sont souvent associées à des poissons capturés dans les zones polluées ou des eaux chaudes tropicales. De même, la charge microbienne des intestins du poisson reflète l'environnement et l'alimentation, des conditions de quasi-stérilité se rencontrant dans le poisson à jeun. Toutefois, des travaux récents semblent indiquer, chez au moins une espèce de poisson (*Gadus morhua*), qu'une flore intestinale spécifique formée de bactéries à Gram négatif du type *Vibrio* à une concentration d'environ 10^7 /g se rencontrent dans tous les poissons, quelle que soit la zone de pêche, la saison ou la nature des aliments contenus dans l'estomac (Huss, 1988).

II. Les risques infectieux :

Dans des circonstances idéales (conditions appropriées de l'eau, un régime comprenant une variété de nourritures, conditions vides, et un environnement manquant d'autre effort) les maladies affectent rarement des poissons. Habituellement les poissons tomberont seulement malades quand quelque chose dans l'environnement n'a pas raison, ou quand le nouveau poisson est ajouté au réservoir. Les poissons sains généralement ont les systèmes immunitaires forts et sont capables de résister à la plupart des microorganismes pathogènes, mais quand l'effort affaiblit les poissons, le poisson devient plus susceptible d'être altéré ou même d'être malade [12].

1. Altérations des poissons :

1.1. Erosion :

✓ Description :

C'est une lésion de la peau ou des muqueuses caractérisée par la destruction généralement lente et progressive des tissus superficiels suite à une lésion pathologique ou traumatique avec un risque éventuel de surinfection.

L'érosion peut être profonde s'il y a destruction de la couche basale des épithéliums de revêtement.

Le terme érosion est également utilisé lorsqu'il y a nécrose de la partie distale des nageoires (Girard et Pierre, 2007).

✓ Causes principales :

- Bactérioses (Vibriose, Flavobactériose...).
- Parasites externes : (Hirudinées, des Copépodes...).
- Carences nutritionnelles ou vitaminiques (Vitamine B,C,...).
- Facteurs environnementaux défavorables (Température, Oxygène, pH,...).
- Pollutions chimiques : HAP brut (Hydrocarbure aromatique polycyclique), Cd (cadmium)...
- Brûlures (U.V. solaires), et engins de capture (Girard et Pierre, 2007).

✓ Symptômes :

Elle touche la couche superficielle du tégument qui devient endommagée ou manquante, laissant apparaître le tissu sous-cutané sous-jacent (Girard et Pierre, 2007).

1.2. Nécrose :

✓ Description :

C'est la mortification de cellules ou d'un tissu organique se produisant du vivant de l'animal par suppression de l'irrigation sanguine, la nécrose, à la différence de l'ulcère, est une lésion irréversible (Girard et Pierre, 2007).

✓ Causes :

Les causes principales sont :

- Bactérioses (Flavobactériose, Vibriose, Pseudomonose) et viroses.
- Parasites externes : (Hirudinées, des Copépodes...).
- Pollutions chimiques : HAP brut (Hydrocarbure aromatique polycyclique), cadmium, chrome, mercure, effluents de pâte à papier, ...
- Pathologies nutritionnelles (carences, toxicité du plomb) et carences vitaminiques (vitamine C).
- Brûlures (UV), traumatismes, et cannibalisme (Girard et Pierre, 2007).

✓ Symptômes :

Elle touche plusieurs parties d'un poisson comme :

- La peau : les premiers stades commencent par des lésions pâles, blanc-grisâtres, qui tendent à devenir noires par la suite, puis la peau se racornit et se dessèche, restant séparée des zones irriguées par un sillon qui la délimite de façon précise.
- Le stade final évolue vers une perte de substance, c'est-à-dire une ulcération, de la zone atteinte.
- La nageoire : elle apparaît déchirée, en lambeaux et ne subsiste, finalement, que sous la forme d'un moignon de couleur blanchâtre (Girard et Pierre, 2007).

1.3. Hémorragie :

✓ Description :

C'est une effusion ou extravasation de sang hors des vaisseaux sanguins (appareil circulatoire) consécutive à un traumatisme ou à une lésion de ceux-ci, engendrée par diverses causes (Girard et Pierre, 2007).

✓ Causes principales :

- Maladies infectieuses : septicémies virales et bactériennes.
- Traumatismes, irritations.
- Carence en vitamine A (Girard et Pierre, 2007).

✓ Symptômes :

Elle symptôme par des hémorragies qui sont divisées en plusieurs catégories :

- le purpura, qui se caractérise par l'éruption sous la peau de taches rouge apparaissant spontanément et de formes et de tailles variables.
- l'érythème, qui est une congestion cutanée qui confère une couleur rouge à la peau, les pétéchies, qui se présentent sous forme de petites taches superficielles lenticulaires rouges ou rouge-violacé de quelques millimètres de diamètre voire moins.
- les ecchymoses, qui forment des taches violacées, aux contours irréguliers et imprécis, de 1 à 2 cm de diamètre.
- les hématomes, le sang provient de la rupture d'un vaisseau et s'accumule dans les tissus, formant une poche plus ou moins grande.

- les hémorragies franches, qui entraînent des pertes importantes de sang, soit à l'extérieur du corps, soit dans les activités corporelles.
- Hémorragies de pétéchies : l'une des conséquences des hémorragies est l'anémie, qui est une diminution de la quantité totale d'hémoglobine fonctionnelle circulante (Girard et Pierre, 2007).

2. Les maladies infectieuses des poissons :

2.1. Les maladies digestives :

2.1.1. Ligulose :

✓ Description :

C'est une sorte de ténia blanc, long de 20 à 40 mm. Il infeste la cavité abdominale des poissons par l'intermédiaire d'un crustacé planctonique et d'un oiseau aquatique. Ce parasite provoque de nombreuses mortalités [13].

✓ Cause :

La cause principale est le plérocercarioïde, appelé *Ligula* sp., se retrouve dans la cavité abdominale des catostomes et des cyprinidés. Ces larves de couleur blanche sont longues de 20 à 30 centimètres, mais atteignent parfois jusqu'à 75 cm et représentent même jusqu'à 50% du poids du poisson. Le ver adulte pond ses œufs dans les fèces de ces oiseaux aquatiques (Beaulieu et al ; 1990).

✓ Symptômes :

Le plérocercarioïde cause beaucoup de dommage chez les petits poissons, entraînant un retard de croissance, la compression des organes abdominaux et l'oblitération ou l'atrophie des gonades provoquant même une castration parasitaire. De l'extérieur, le ventre des poissons infestés est gonflé dans la région du cœur, la peau devient fine avec des enflures irrégulières et parfois, la cavité abdominale éclate sur la pression, provoquant la mort du poisson (Beaulieu et al ; 1990).

2.1.2. Gangrène des poissons :

✓ Description :

C'est une affection qui correspond à une mort cellulaire (nécrose) pouvant atteindre une partie du corps comme le plus souvent un membre ou un organe [14].

✓ Cause :

La bactérie responsable de cette maladie est de type *Edwardsiella tarda* provenant à la famille des entérobactéries [15].

✓ Symptômes :

Parmi les symptômes caractérisant cette maladie sont :

- Hémorragie de pétéchies.
- Présence dans le muscle de gangrène (petites à grandes) pleine de gaz nausée a bond [15].

2.1.3. Les atteintes cutanées :

a. La furonculose :

✓ Description :

C'est une hémorragie qui touche les nageoires dorsale et adipeuse, la partie terminale de l'intestin, la peau, la bouche, l'anus, peut atteindre le foie, les reins et la rate [16].

✓ Cause :

Un bâtonnet à Gram négatif nommé *Aeromonas salmonicida* est en cause.

Des poissons porteurs (sains et malades) sont la source de contamination la plus fréquente. La bactérie peut cependant résister quelques semaines dans un environnement humide. La transmission de cette maladie semble être plus facile entre un poisson porteur et un poisson naïf, malgré que la transmission par voie mécanique (p.ex. équipement contaminé) soit une possibilité (Ulhand, 2004).

✓ Symptômes :

C'est une maladie qui peut montrer une mortalité très importante avec ou sans signes cliniques. Les signes les plus souvent notés sont des hémorragies cutanées au niveau des nageoires pectorales et pelviennes, ainsi que sur le tissu branchial.

Les poissons qui ont survécu à une épidémie peuvent développer des furoncles intramusculaires contenant un liquide épais et sanguinolent (tissu et sang nécrotique, et des bactéries).

Ce type de lésion est indicatif d'une infection chronique qui origine probablement d'une infection initiale survenue lors de la saison estivale précédente (Ulhand, 2004).

b. La maladie de la selle/la maladie de l'eau froide :

✓ Description :

Ce sont des ulcérations cutanées constatées autour de la nageoire dorsale (Ulhand, 2004).

✓ Cause :

Flavobacterium columnare / *Flavobacterium psychrophilum*, sont des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet filamenteux, qui causent les maladies cutanées chez les poissons. Comme pour la maladie bactérienne des branchies, ces bactéries sont omniprésentes dans l'environnement aquatique, et les poissons qui en sont affectés sont également une source d'infection importante pour d'autres poissons. Les dommages à l'épiderme (manipulations brusques), les extrêmes de températures (températures basses (<4°C) dans le cas de *Flavobacterium psychrophilum* et les températures élevées (>18°C) dans le cas de *Flavobacterium columnare* sont les principaux facteurs de risque pour ces maladie cutanées (Ulhand, 2004).

✓ Symptômes :

Les signes clinique peuvent commencer par de légères érosions des nageoires (dorsale et caudale le plus souvent) dans les cas sévères, une érosion complète de la nageoire impliquée est possible avec nécrose de la peau et du tissu musculaire environnant (Ulhand, 2004).

c. Gyrodactylose :

✓ Description :

C'est une maladie qui touche la peau des poissons et affectant aussi (les nageoires : taches sanguinolentes punctiformes, nécrose) (Euzéby, 2008).

Elles peuvent causer de graves dégâts, et sont précurseurs d'infections bactériennes secondaires (Alexander, 2005).

✓ Cause :

La cause principale est les *Monogènes*, qui sont des métazoaires parasites de petite taille (quelques dizaines de micromètres à plusieurs millimètres), ayant un cycle biologique direct, c'est à dire sans hôte intermédiaire (Silan et al., 1999).

De la famille des *Gyrodactylidae*, des genres *Gyrodactylus*. La famille des *Gyrodactylidae* sont des vers ectoparasites dont la longueur varie entre 0.3 et 1.00 mm (Uhland et al., 2000). Ce sont des vers qui peuvent se reproduire extrêmement vite quand le milieu est favorable et ils se répandent sur les branchies et la peau de leur hôte (Alexander, 2005) à l'aide de petits crochets situés dans la région caudale et d'un organe de fixation situé près de la tête (Uhland et al., 2000).

✓ Symptômes :

La fixation du parasite et ses activités d'alimentation irritent la peau et les branchies du poisson et prédisposent ces organes aux infections secondaires. Lors d'infections sévères, Le poisson révèle alors une peau surchargée de matériel cuticulaire (Alexander, 2005). La production de mucus dans les régions atteintes s'accroît, ce qui donne un aspect luisant et bleuâtre aux lésions. On note également des lésions épithéliales hyperplasique, des ulcères cutanés, une nécrose du bout des nageoires et des difficultés respiratoires. (Uhland et al., 2000), Ils se transmettent par contact direct seulement aux poissons de la même espèce en raison de leur grande spécificité. (Alexander, 2005).

En Inde, de fortes infections cutanées entraînent chez les Cyprinidés une perturbation des couleurs, la perte des écailles, l'érosion de la peau et une production excessive de mucus (Uhland et al., 2000).

Tableau 01 : Liste de maladies d'origine bactérienne rencontrées ou pouvant apparaître chez les poissons [17].

Nom de la Maladies	Agent causal	Principaux symptômes
Bactériose septicémique	<i>Aeromonas hydrophila</i> , De la famille des <i>Vibrionaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Anorexie. • Nage littorale. • Nécrose profonde évoluant en lésions ouvertes. • Exophtalmie. • Dégénérescence des nageoires. • Intestin vide d'aliment.
Maladie causée par <i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i> famille des <i>Enterobacteriaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sévère hémorragie de la peau. • Forte rougeur des mâchoires. • Ballonnement. • Lésions très ouvertes au milieu de la tête.
Vibriose	<i>Vibrio anguillarum</i> , famille des <i>Vibrionaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Symptômes semblables à ceux d'<i>Aeromonas hydrophila</i>. Taux de mortalité 70 à 80 % dans forme sévère.
Septicémie causée par les streptocoques	<i>Streptococcus sp.</i> , famille des <i>Streptococcaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hémorragie operculaire. • Inflammation tout au long de la dorsale. • Saignement anal. • Hydropisie (poisson ballonné avec des écailles dressées). • Augmentation (10 fois) de la bile.

Suite de tableau 01 :

<p>Maladie des écaillés érigées</p>	<p><i>Pseudomonas punctata</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Surface rugueuse du corps. • écaillés érigées et les sacs des écaillés remplis de sang. • difficulté de respiration et de garder l'équilibre. • ventre gonflé et mouvement lent. • mortalité élevée.
<p>Stigmatose</p>	<p><i>Aeromonas punctata</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Taches rondes et rouges sur la peau et les muscles près de l'anus des poissons. • perte d'écaillés. • pourriture de la peau et des muscles atteignant même les os. • physiquement faibles et mouvements lents. • alimentation très réduite. • meurent finalement par épuisement.

2.1.4. Les maladies respiratoires :

a. Hyperplasie des branchies:

✓ Description :

C'est une atteinte des branchies par une bactérie : *Flavobacterium branchiophila*. Des facteurs prédisposant comme des stress ou une mauvaise qualité de l'eau ont été évoqués pour expliquer le développement de l'infection mais, la maladie a pu être reproduite chez des poissons élevés dans de bonnes conditions (BARBIER, 2013).

✓ Cause :

Flavobacterium branchiophilum est la bactérie la plus souvent impliquée dans le syndrome "maladie des branchies" ou "bacterial gill disease" (BARBIER, 2013), C'est une bactérie non mobile à Gram négatif. Cette bactérie est un habitant normal de l'environnement aquatique (Uhland et al., 2000).

✓ Symptômes :

La multiplication des bactéries sur les tissus branchiales entraîne l'hyperplasie des cellules épithéliales et la fusion subséquente des filaments branchiaux. Le tissu branchial affecté est enflé, et sa surface rose pâle est luisante. Les lésions diminuent la capacité des branchies à extraire l'oxygène du milieu aquatique environnant. Les poissons se tiennent souvent à la surface de l'eau où la teneur en oxygène est plus élevée (Uhland et al., 2000).

b. Trypanoplasma

✓ Description:

C'est une maladie qui affecte les branchies des poissons entraînant ainsi des difficultés respiratoires ou une respiration rapide [18].

✓ Cause :

Causée par un protozoaire *Cryptobia branchialis* de (0.02) de millimètre. Ce parasite est présent dans le sang [18].

✓ Symptômes:

Les symptômes de cette maladie sont plus ou moins nombreux. La maladie est constatée par la coloration foncée du poisson atteint, une augmentation de mucus, la viscosité de la peau, perte d'écailles, la difficulté respiratoires ou une respiration rapide, la diminution de l'appétit et la perte de poids. Les infections bactériennes secondaires à un stade avancé peuvent en général provoquer des correctifs de la peau (pâle ou rouge) et aussi la pourriture des nageoires [18].

c. Ergasilus :

✓ Description :

C'est une érosion de l'épithélium sur les branchies des poissons. Il en résulte alors une infestation massive se traduisant par une détresse respiratoire et des troubles métaboliques graves (FOIN Alexander, 2005).

✓ Cause :

Ergasilus sp. Ressemble à un Cyclops, mais ses antennes se sont modifiées en crochets pour lui permettre de se fixer sur un poisson. Le mâle mesure environ un (1) mm et la femelle un et demi (1.5) à deux et demi (2.5) mm. Seules les femelles sont parasites. La femelle s'attache alors à un hôte et produit ses œufs tous les trois ou douze jours, dépendant

de l'espèce et de la température. Les larves vivent à l'état libre. Seules les femelles hibernent sur le poisson (Beaulieu et *al.*, 1990).

✓ Symptômes :

Les symptômes de cette maladie apparaissent par la fixation de copépodes ectoparasites sur les branchies et même, dans les cas d'infestation massive, sur la peau et les nageoires. Ils provoquent des adhésions entre les filaments et entravent bientôt la respiration du poisson.

On constate une perte de sang importante et des infections secondaires, telles que la pourriture des branchies (Beaulieu et *al.*, 1990).

Ce parasite causant aussi des plaies, le poisson peut subir une surinfection bactérienne ou mycosique et entraîne un retard dans la croissance et la maturité sexuelle (Beaulieu et *al.*, 1990).

Les travaux de laboratoire ont été réalisés au niveau de laboratoire de microbiologie de département de biologie de l'Université de Guelma.

1. Présentation de la zone d'étude

1.1. Description du canal Messida :

a. Situation géographique

Le canal Messida est un Oued artificiel creusé par les français pendant l'époque coloniale afin d'assécher le lac Tonga. Il présente une altitude égale à 0 et de ce fait il coule dans les deux sens suivant le niveau d'eau du lac. Ainsi, en hiver l'écoulement se fait du lac vers la Méditerranée et en été, il coule dans le sens inverse (Zeraoula, 2011).

Le canal Messida reliant le lac Tonga (site RAMSAR) à la mer méditerranée est localisé dans le Parc National d'El-Kala (PNEK) à l'extrême Nord-Est de l'Algérie (Fig.1).

Il est limité par le lac Tonga au Sud, la mer Méditerranée au Nord, les plaines de la commune de Souarekh à l'Ouest et les pinèdes qui fixent la plus grande partie de la dune de la plage Messida à l'Est.

Ses coordonnées géographiques sont comprises entre 36° 53' 60 N et 8° 31' 0 E, à environ 22 km de la frontière Algéro-Tunisienne à l'Est et à l'Ouest d'environ 11 km de la ville d'El kala.

Le canal est alimenté par les eaux du lac qui est considéré comme le distributeur principal de l'Oued, ainsi que par deux autres distributeurs secondaires : la nappe dunaire de Maloul et la nappe dunaire de la pinède Tonga voisine surtout dans la période sèche où ces deux nappes dégagent les eaux vers l'Oued (Zeraoula, 2011).

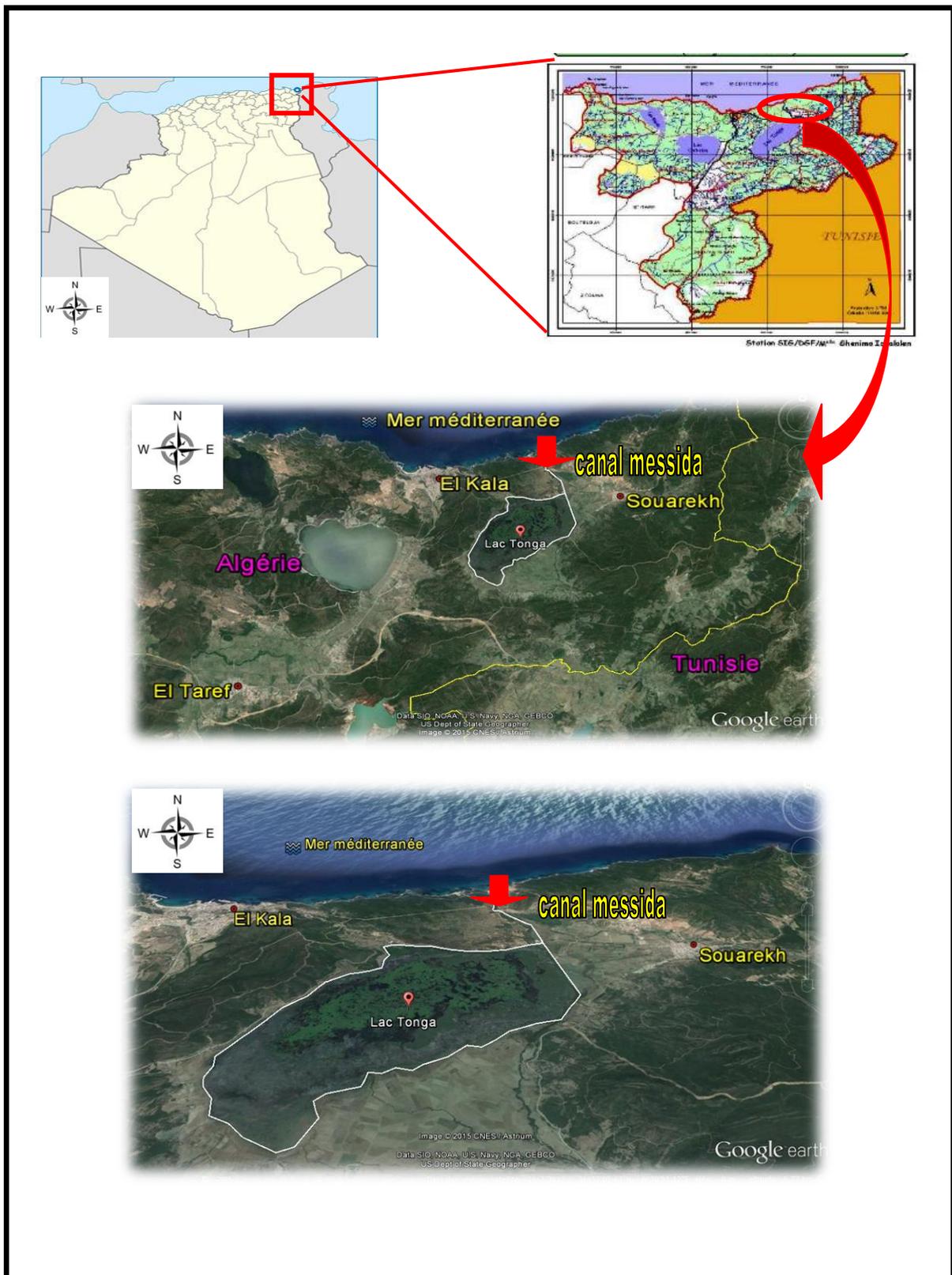


Figure 01 : Carte de localisation du site d'étude (Google Earth, 2015).

b. Caractéristique du canal Messida :

Les caractéristiques du canal Messida sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 02 : les principaux caractères du canal Messida

(Bazine et Bourenane,2011).

Cours d'eau	Canal Messida
Type	Canal
Largeur moyenne (m)	>3
Profondeur moyenne (m)	1-2.5
Vitesse du courant	Modérée
Type du terrain (lit du cours d'eau)	<ul style="list-style-type: none"> • A dominance : de sable • Peu de : gravier, grosses pièces, boue
Conditions du fond	<ul style="list-style-type: none"> • Branches • Feuilles • Peu de déchets • Matière organique en décomposition
Structure des bords	Naturelle
Exposition	Ouvert
Végétation aquatique	<ul style="list-style-type: none"> • Sur les bords :abondante • Au milieu : modérée
Environnement aux alentours	<ul style="list-style-type: none"> • Auberge • Agriculture • Pâturage • Quelques habitations

c. Diversité biologique du canal Messida :

De par sa localisation, le canal Messida héberge une faune et une flore bien diversifiée.

• La faune :

Le canal Messida constitue un habitat pour plusieurs espèces animales d'immenses valeurs [2]:

- Des oiseaux migrateurs et hivernant (dont des canards, foulques et autres).
- Des poissons d'eau douce (l'anguille *Anguilla anguilla*, la Carpe commune *Cyprinus cyprio*, la Gambusie *Gambusia affini*, carassin commun *Carassius carassius...*).
- Des herbivores et des insectes.

La faune recensée, reste insuffisante et ne représente qu'une fraction de la véritable richesse biologique du site.

• La flore :

Le lit du canal Messida est caractérisé par une organisation typique de végétation, sa superficie est encombrée d'herbiers flottants, d'hydrophytes courant le plan d'eau en partie.

La végétation aquatique est à dominance de :

Lamnaminor callitriche sp., *Lemnatisulca*, *Nymphaea alba*, *Alisma plantago aquatica*, *Mille feuilles* *Myriophyllum spicatum*, *Typha angustifolia*, *Veronica* sp. et *Cynodondactylon*.

d. Intérêt écologique du canal Messida :

Les eaux du canal sont destinées à :

- L'agriculture qui est le premier secteur de consommation d'eau, notamment pour l'irrigation (au niveau de la pépinière du Tonga).
- Corridor biologique permette aux civelles d'anguilles et autres espèces de se déplacer de la mer vers le lac Tonga et vice versa.
- Ecosystème recèle une diversité biologique importante par la faune et la flore qu'elle abrite, ce qui lui confère un rôle de conservation important (reproduction, développement).
- Lieu où les animaux qui vivent aux alentours (vaches, chèvre, chevaux...) abreuvent

- Offre un milieu favorable aux scientifiques et aux chercheurs qui engagement leurs recherches sur diverses problématiques liées aux milieux aquatiques.
- Place pour la chasse, la pêche, loisirs, et activités touristique.

2. Présentation de l'espèce étudiée : le carassin commun :

2.1. Identification, biologie et morphologie du modèle biologique :

Le carassin commun est un poisson *typiquement lacustre*, peuplant les eaux dormantes, tièdes ou chaudes. Il fréquente les zones littorales des lacs, les étangs peu profonds et les marécages. Il abonde en Roumanie dans les secteurs du Danube (Papadol, 1969) à courant lent (il est rarement présent dans le lit majeur du fleuve) et surtout dans les eaux stagnantes (bras-morts, zones inondables et marais du delta). Il est apte à supporter des eaux saumâtres de salinité maximum de 10mg/l (Bruslé et Quignard, 2013).

Le carassin commun est un poisson qui existe en Algérie depuis très longtemps, mais ne fait pas partie de sa faune naturelle. Il s'agit d'espèce introduite. D'après les données historiques, la première est arrivée en 1860 dans les oueds de la Mitidja dans le but de développer la pêche continentale et s'est par la suite répandu sur tout le territoire, la seconde en 1930 dans un but ornemental (Kara, 2013).

Sa biologie est comparable à celle de la carpe *Cyprinus carpio*, il est sensible aux eaux froides et en raison de son caractère thermophile, recherche les eaux chaudes (15 à 20°C), il supporte jusqu'à 30°C et plus. Très rustique, le carassin commun présente une grande résistance au manque d'oxygène, à l'acidité des eaux (pH 4,5) et aux pollutions, d'où sa grande faculté d'adaptation (avec une capacité d'hibernation par enfouissement dans la vase). Grégaire, il vit par groupes et affectionne les zones riches en végétaux aquatiques (Bruslé et Quignard, 2013).

Le régime alimentaire du carassin commun est à base des plantes aquatiques et des petits organismes benthiques, en particulier des larves de chironomes. Les juvéniles (<10 cm), qui sont les plus vulnérables à la prédation, consomment une plus faible quantité de proies (Invertébrés) en présence d'un prédateur, la perche *Perca fluviatilis*, qu'en son absence (Paszkowski et al., 1996 ; Bruslé et Quignard, 2013).

Le carassin mesure 20 à 35 cm, maximum 50 cm, et pèse jusqu'à 1 Kg (Bruslé et Quignard, 2013). La couleur de son dos est brunâtre à reflets verdâtres, flancs brun-jaunâtres à reflets mordorés et ventre blanc-jaunâtre avec une tache sombre sur le pédoncule caudal (Fig.2) (Bruslé et Quignard, 2013).

La maturité sexuelle du carassin commun est atteinte au cours des 2^e-3^e ou 4^e années de vie selon les latitudes (à une taille de 11-13 cm et un poids de 85-100g). La maturation sexuelle des femelles est conditionnée par des températures chaudes en photopériode longue (Papadol, 1969).

La saison de reproduction commence en mai et dure jusqu'à environ juin/juillet en Europe à des températures supérieures à 18°C. La reproduction a lieu dans des biotopes avec une végétation submergée dense. Les femelles pondent individuellement avec plusieurs mâles. Les mâles suivent les femelles matures, souvent avec beaucoup d'ébats frénétiques puis les femelles pondent 3 à 5 fois durant la saison.

Les œufs sont collants et sont attachés aux feuilles de plantes aquatiques [3].

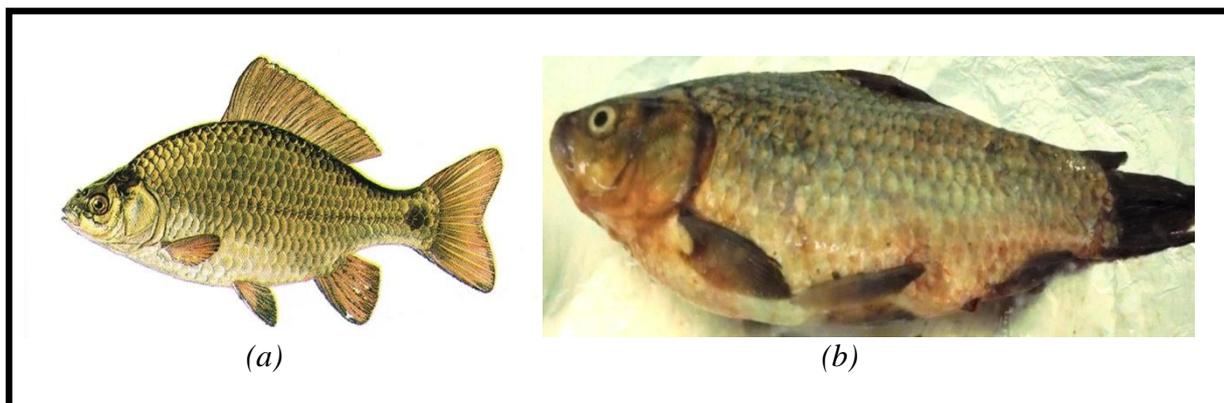


Figure 02: le carassin *Carassius carassius*((a) : Engelhardt, 1998 ; (b) : (photos prise par Rezig, 2015).

2.2. Position systématique de carassin *Carassius carassius* [23] :

Embranchement: *Chordata*

Sous-embranchement: *Vertebrata*

Super- classe : *Osteichthyes*

Classe : *Actinopterygii*

Sous-classe : *Neopterygii teleostei*

Super- ordre : *Ostariophysi*

Ordre : *Cypriniformes*

Sous- ordre : *Cyprinoidea*

Famille : *Cyprinidae*

Genre : *Carassius*

Espèce : *carassius*

2.3. Intérêt :

Le carassin commun est couramment utilisé dans les chenaux et bassins envahis par une végétation aquatique nécessitant la pratique (couteuse) de fréquents faucardages.

Sa consommation de macrophytes et d'algues filamenteuses permet de réduire cette biomasse végétale et favorise une production animale de qualité. Cette espèce est donc devenue populaire pour la gestion rationnelle des plans d'eau et le contrôle de la végétation aquatique (Fischer et Lyakhnovich, 1973) toutefois, sa présence dans des canaux d'irrigation peut conduire à une disparition de la végétation utilisée par un certain nombre de Cyprinidés phytophiles.

Ce poisson profite parfois du réchauffement des eaux et occupe la place laissée vacante par la disparition des espèces souffrant d'une dégradation de leurs habitats (Bruslé et Quignard, 2013).

3. Stratégie d'échantillonnage :

3.1. La pêche du carassin commun :

Trois espèces de poisson sont recensées dans le canal Messida durant notre période d'étude : l'anguille *Anguilla anguilla*, le Carassin *Carassius carassius* et la Gambusie *Gambusia affinis*. Seul le carassin fait l'objet de notre étude à raison de sa présence abondante et sa consommation dans la région d'étude.

Les poissons sont capturés par un système de nasse au niveau de trois points d'échantillonnages (Fig.3).

- Premier point d'échantillonnage (S1) : l'exutoire du lac Tonga ($36^{\circ}53'1.70''\text{N}$, $8^{\circ}31'47.03''\text{E}$), avec une profondeur maximal d'eau de 1,20 m.
- Deuxième point d'échantillonnage (S2) : au centre du canal ($36^{\circ}53'51.63''\text{N}$, $8^{\circ}31'8.61''\text{E}$).
- Troisième point d'échantillonnage (S3): l'embouchure de la Méditerrané (environ 100m de la mer), sa profondeur maximale d'eau est d'un mètre ($36^{\circ}54'26.91''\text{N}$, $8^{\circ}31'6.79''\text{E}$).

Ces sites présentent des caractéristiques biotiques et environnementales assez similaires (Benhalima et *al.*, 2013), une accessibilité facile et un impact anthropique remarquable (pêche artisanale, fréquentation touristique, rejets des déchets...).

Remarque :

La nasse utilisée est un piège destiné généralement à la capture des poissons, classé dans la catégorie « pêche aux engins », elle a une hauteur de 0,65 m, un diamètre de 0,70 m et des mailles avec un diamètre de 27 mm. Son principe est relativement simple : Attirer généralement par un appât positionné à l'intérieur de la nasse, le poisson guidé par l'entonnoir, pénètre dans la nasse par le goulot plus ou moins étroit. Et une fois à l'intérieur, il lui est bien plus difficile de s'en échapper. Les nasses doivent être couchées. Chaque engin est lesté par une grosse pierre qui la fixe au fond (Ghachem, 1984).



Premier point de prélèvement (S1)



Deuxième point de prélèvement (S2)



Troisième point de prélèvement (S3)

Figure 03 : vues générale des points de prélèvements (Google Earth, 2015).

3.2. Fréquence et transport des échantillons :

Un échantillonnage mensuel est réalisé dans les 3 points de prélèvement durant la période s'étalant de février à Mars 2015.

L'étude bactériologique a nécessité l'utilisation de 2 à 3 individus (selon la taille) par point de prélèvement; les poissons destinées à cette étude sont recueillies dans des sacs propres et étiquetés (date et heure, point de prélèvement, espèce) puis entreposés dans une glacière désinfectée et maintenue à une température comprise entre 4°C à 6°C.

Les analyses bactériologiques ont été débutées dans un délai maximal de 24 heures, après le recueil de l'échantillon (Rodier et *al.*, 2009).

4. Méthode d'analyse :

4.1. Examen macroscopique des poissons :

Sur chaque poisson fraîchement pêché ont été entrepris in situ des examens macroscopiques externes destinés à noter toute altération ou lésion éventuelle et détermination de la prévalence globale des poissons atteints (P%) selon la méthodologie « Code pathologique » (Girard, 1998).

L'outil « Code pathologique » est un bio-indicateur pertinent à la fois de la qualité de l'eau et du milieu et de la qualité du peuplement et des populations en place (Girard, 1998).

Girard (1998) estime que la qualité de l'eau ou des habitats est altérée lorsque la prévalence (P%) des lésions externes est supérieure à 5% conformément à la grille suivante :

Tableau 03: codes pathologiques (Girard 1998).

Prévalence	Qualité de l'eau et de l'habitat	Classe agences de l'eau
< 1%	Excellente	1 A
1-5 %	Bonne	1B
5-20 %	Médiocre	2
20-35%	Mauvaise	3
>35 %	Très mauvaise	HC

4.2 Détermination du poids, sexe des poissons et le pH des différentes parties du corps:

- les individus ont été pesés à l'aide d'une balance de précision (SCOUT™ Pro, 200g) (Fig 4).



Figure 04: détermination du poids des poissons (photos prise par Dali, 2015).

- La distinction des sexes est relativement aisée notamment durant la période de gamétogénèse avancée ; en effet, elle est basée sur la couleur du gonade qui est blanchâtre chez les mâles et rose saumon à orange chez les femelles. Pour ce faire, les poissons sont nettoyés, ouverts et sexés d'après l'observation macroscopique de la coloration des gonades.
- Afin de déterminer le pH de chaque partie du corps à étudier, nous avons homogénéisé chaque échantillon dans l'eau distillée stérile (v : v) puis nous avons mesuré le pH à l'aide d'un pH-mètre (HI 2211 pH/ORPMeter) (FAO / OMS, 2011).

5. Analyse bactériologique :

Dans la présente étude nous avons isolé le maximum des bactéries présentes dans différentes parties de corps du carassin commun peuplant les eaux du canal Messida. Les parties étudiées sont : le mucus, les branchies et la chair.

Dès l'arrivée au laboratoire, on a placés les poissons dans une zone stérile sur un plateau métallique stérilisé préalablement à l'autoclave (120°C pendant 20 minutes), afin de prélever les différentes parties de corps du carassin commun.

Choix des parties du corps : la localisation des bactéries du poisson au niveau des branchies et la peau est expliquée par le contact direct avec l'eau lors de la respiration et le déplacement, donc l'étude de ces parties nous donne une idée sur la qualité de l'eau dans laquelle le poisson a été pêché selon Bourgeois (1988). L'étude de la qualité de la chair nous permet d'envisager le risque sanitaire liée à la consommation de ces poissons.

5.1.Méthode de collecte des différentes parties du corps du poisson :

➤ Le mucus :

- A l'aide d'un écouvillon stérile, prélever le mucus dorsale du poisson sur une surface totale de 50 cm², le mucus ventrale n'a pas été prélevé puisque ce dernier peut être se contaminé par les sécrétions intestinales et génitales.
- Immerger l'écouvillon dans 5 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une solution mère (Fig.5).
- Mélanger pendant 10 minutes (Ozaktas *et al.*, 2012).

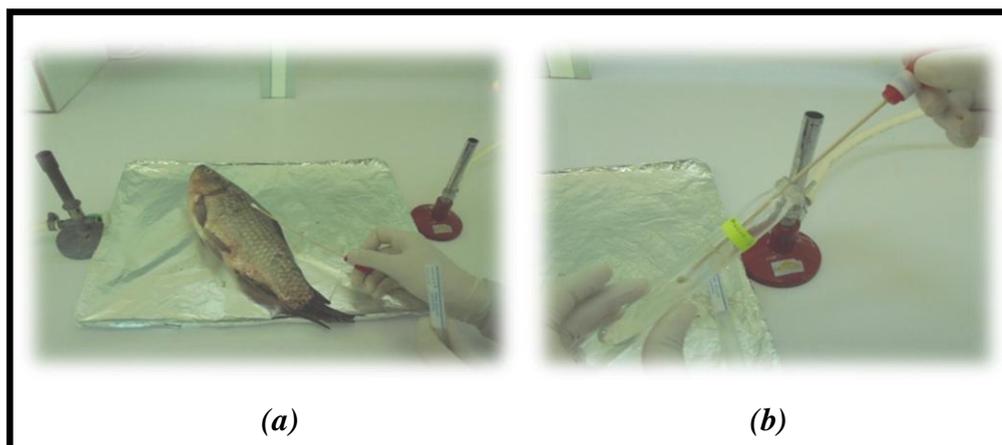


Figure 05 : (a) Prélèvement et (b) préparation de la solution mère de Mucus

(Photos prise par Aouadi, 2015).

➤ Branchie et chair : (Fig. 6, 7)

- Couper à l'aide d'un scalpel stérile et en zone stérile les parties à étudier.
- Peser aseptiquement 10 g de chaque partie (branchie, muscle), puis la déposée dans 90 ml d'eau physiologique à 0,85 % et broyer (à l'aide d'un mortier et d'un pilon en porcelaine préalablement stérilisés) et mélanger pendant 2 minutes pour obtenir une solution mère (Borges *et al.*, 2014).

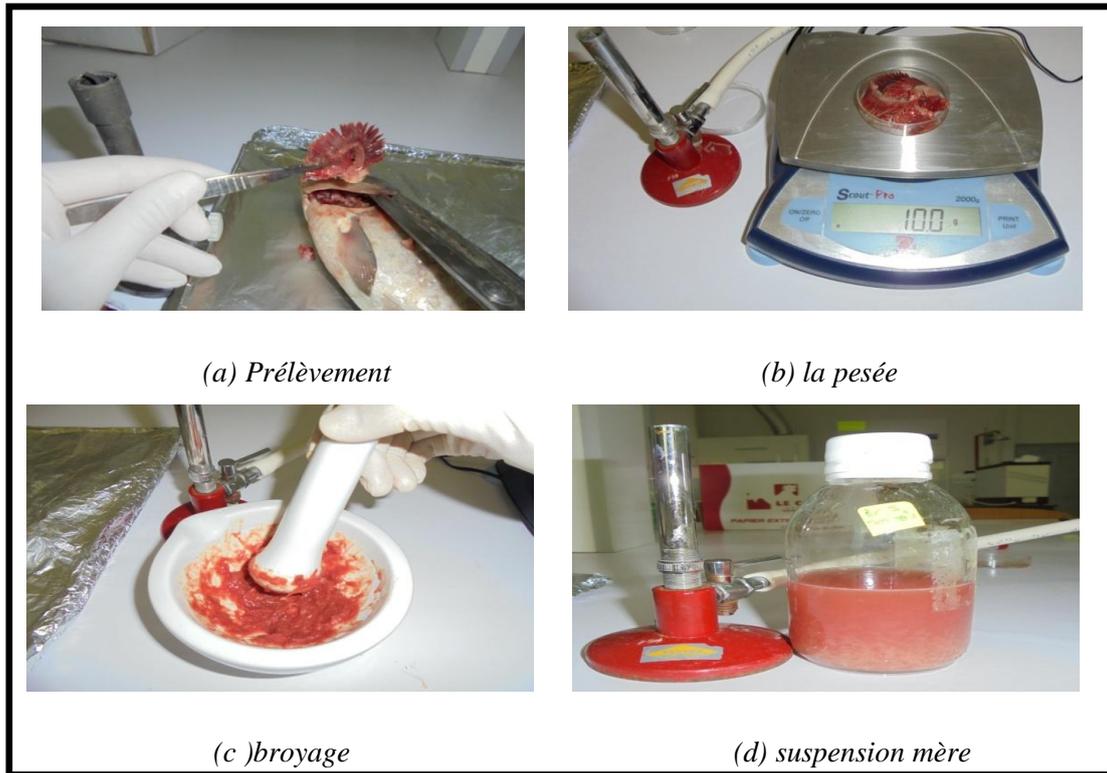


Figure 06 : Méthode de prélèvement et de préparation de la solution mère des branchies (photos prise par Rezig, 2015).

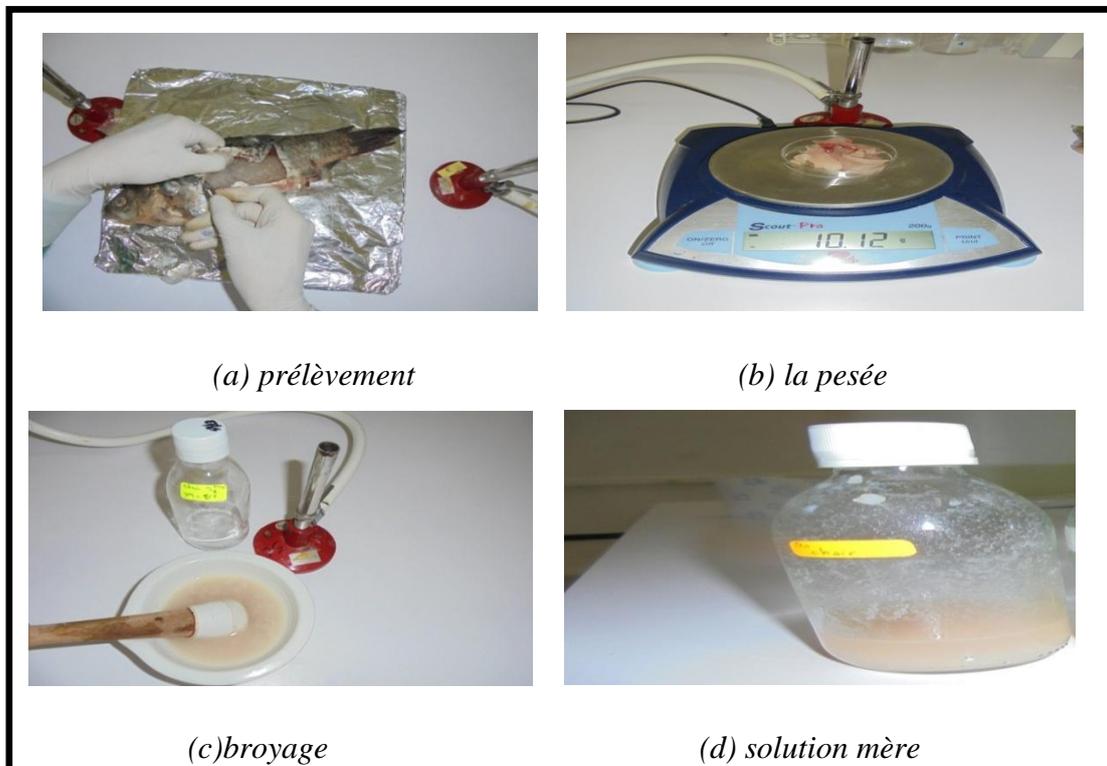


Figure07 : méthode de prélèvement et de préparation de la solution mère de la chair (photos prise par Dali, 2015).

5.2. Isolement et identification des bactéries présentes dans les différentes parties du corps de poisson :

5.2.1. Entérobactéries (schéma 01):

a. Isolement :

❖ *Pré Enrichissement :*

Cette étape a été réalisée uniquement pour la recherche des Salmonelles et Shigelles.

Le pré-enrichissement s'effectue sur le milieu eau péptonée tamponnée D/C réparti à raison de 10 ml par flacon. Ce dernier sera doncensemencé à l'aide de 10 ml de la solution mère à analyser, puis incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures (Larpent, 1997).

❖ *Enrichissement:*

- A partir du milieu de pré-enrichissement, nous ensemençons un bouillon au Sélénite-Cystéine avec un volume d'échantillon correspond au 1/10 du volume du bouillon.
- L'incubation se fait donc à 37°C pendant 24 h (Larpent, 1997).

❖ *Isolement (proprement dite):*

Trois milieux de culture ont été utilisés :

- La gélose Mac Conkey : milieu sélectif pour les entérobactéries en général, elle permet l'élimination de la flore secondaire grâce à l'action de deux inhibiteurs : le cristal violet (inhibiteur de la flore Gram positive) et les sels biliaries (sélection des Entérobactéries). (Larpent, 1997).
- La gélose Hektoen : c'est le milieu de choix pour l'isolement des entérobactéries pathogènes. Ce milieu permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer (Larpent, 1997).
- La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) : c'est le milieu sélectif des Salmonelles et des Shigelles. Il contient du vert brillant, sels biliaries et de fortes concentrations en thiosulfates

et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes et *Proteus* (Larpent, 1997).

Les géloses SS, Hektoen et Mac Conkey ont étéensemencés avec 0.1 ml de culture prélevée en milieu d'enrichissement. Toutes les boîtes sont incubées à 37° C pendant 18 à 24 H (Larpent, 1997).

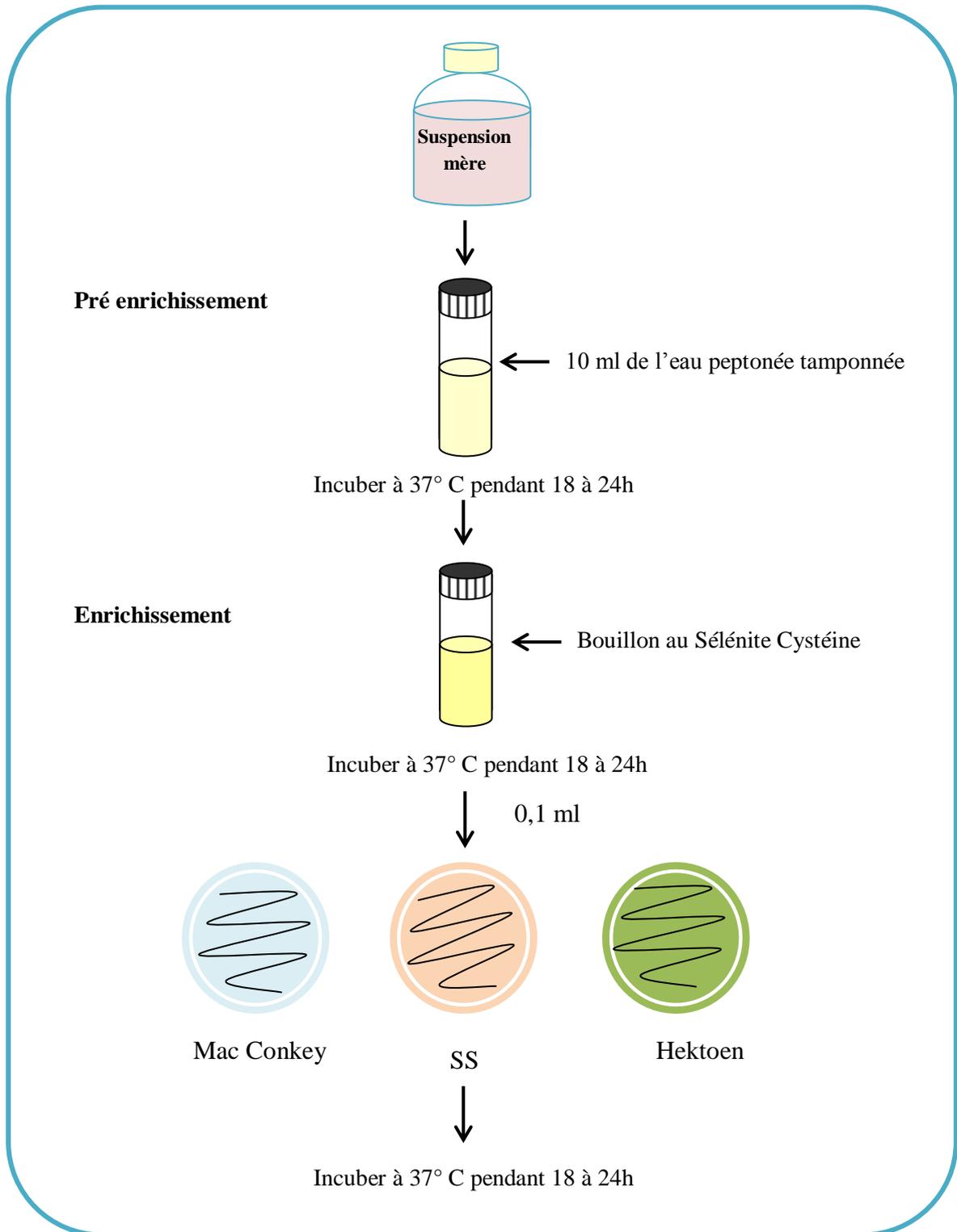


Schéma 01 : Isolement des Entérobactéries (Larpent, 1997).

b. Identification :**➤ Examen macroscopique :**

À l'œil nu, on peut distinguer les caractéristiques d'une colonie : La forme du relief, la taille, la couleur, l'aspect (collant, filamenteux...), l'odeur, la transparence, et l'allure des contours (Light foot Nigel Francis, 2002).

L'aspect des colonies suspectes des entérobactéries sur chaque milieu de culture utilisé est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Aspects cultureux des Entérobactéries sur les milieux sélectifs

(Rodier, 2005).

Milieu d'isolement	Micro-organismes	Colonies
Mac Conkey	- <i>E. coli</i> . - <i>Salmonella, Shigella</i> et autres. - <i>Enterobacter, Klebsiella</i> .	-Grandes, rouges. -Incolores, transparentes. -Grandes Roses, visqueuses.
Hektoen	- <i>E.coli, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Arizona</i> . - <i>Citrobacter freundii, Proteus vulgaris</i> . - <i>Proteus mirabilis, Salmonella</i> . - <i>Shigella, Providentia, Proteus morgani, Proteus rettgeri, Salmonella</i> à H ₂ S négatif.	- jaunes saumon. - jaunes saumon à centre noir -bleues ou vertes à centre noir - blanchâtres ou vertes.

Suite du tableau04 :

SS	- <i>Salmonella</i> à H ₂ S(+), <i>Proteus vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>	- incolores à centre noir
	- <i>Salmonella</i> à H ₂ S(-), <i>Shigella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus morganii</i>	-incolores transparentes
	- <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Providencia</i>	-des colonies à centre orangé

➤ **Examen microscopique :**• **Etat frais :**

L'examen microscopique à l'état frais permet d'apprécier à la fois la forme, le mode de regroupement et la mobilité des bactéries isolées (Light foot Nigel Francis, 2002).

Technique :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine une fraction de la colonie sur milieu gélosé.
- Effectuer une suspension homogène dans la goutte d'eau physiologique en incorporant l'inoculum.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulle d'air.

L'observation s'effectue à faible luminosité à l'objectif X10 puis X40 (Light foot Nigel Francis, 2002).

• **Coloration de Gram :**

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif. Elle nous permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement de bactérie (Degrement, 2005).

- **Principe :**

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante :

- **Préparation d'un frottis bactérien :** on prélève la colonie bactérienne à identifier, et on l'étale sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis on la fixe par simple passage sur la flamme du bec bunsen.

- **Coloration par le violet :** chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite lavé rapidement par l'eau courante.

- **Mordantage :** traité durant une minute par la solution de Lugol et lavé à l'eau.

- **Décoloration :** en traitant avec l'alcool, c'est une étape critique, on fait couler le solvant sur le frottis pendant une à trois secondes puis lavé immédiatement à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes.

- **Recoloration :** on soumet le frottis durant trente secondes à une courte coloration par la fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis rincer et sécher entre deux feuilles de papier buvard propre.

- **Examiner le frottis :** à immersion à l'objectif $\times 100$ (Joffin et Leyrol, 2003).

- **Lecture :**

Les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries Gram négatif sont bien colorées en rose.

➤ **Recherche des enzymes respiratoires:**

- **Oxydase :**

Principe :

Ce test à la base de l'identification des bactéries Gram-, permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthylparaphénylène diamine.

Technique :

- Déposer un disque pré-imprégné par le Réactif N diméthylparaphénylène diamine (disque oxydase) sur une lame propre.
- Imbiber le disque d'une goutte d'eau distillée stérile.
- Déposer au-dessus une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Etaler la colonie sur le disque.
- Attendre 3 à 5 secondes (Light foot Nigel Francis, 2002).

Lecture :

- Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase : le test est positif.
- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif (Light foot Nigel Francis, 2002).

- **Nitrate réductase :**

Principe :

- Certaines bactéries peuvent utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons, c'est la respiration nitrate.
- La Nitrate Réductase est une enzyme catalyse la Réduction des nitrates en Nitrites suivant la Réaction suivante : (Delarras, 2000).

**Techniques :**

- ensemencer un bouillon nitraté (1% de KNO_3) avec de la suspension bactérienne à étudier.
- Incuber à 37°C pendant 48h.
- La mise en évidence de l'apparition des nitrites par l'addition de 3 gouttes d'acide parasulfanilique (NIT I) puis 3 gouttes d'alpha naphtylamine (NIT II) (Delarras, 2000).

Lecture :

Elle est immédiate.

- Le milieu devient rouge : présence de nitrites.

Donc la bactérie possède un nitrate réductase. Résultat Nitrate Réductase (+)

- Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase vis à vis des nitrates :
 - Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Résultat Nitrate réductase (-).
 - Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR+ (Delarras, 2000).

➤ Identification biochimique :

L'identification des différentes bactéries isolées a été réalisée grâce à la galerie biochimique classique pour certaines souches et par la galerie biochimique miniaturisée API 20E (Bio Merieux) pour d'autres souches.

• Galerie biochimique classique :

Les tests biochimiques qui ont été effectuée dans notre étude sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 05: Tests biochimiques utilisés pour l'identification des entérobactéries.

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
Fermentation des sucres avec ou sans gaz + Production d'H₂S.	-Utilisation du glucose, saccharose et lactose. -production d'H ₂ S. -production de gaz	-Ensemencement de la pente du milieu TSI par stries et le culot par simple pique. -Après 24H à 37°C, la pente jaune= fermentation du glucose ; culot jaune= fermentation du lactose ; noircissement= H ₂ S+, bulles gazeuses= production du gaz	Delarras, 2000
Citrate de Simmons	-utilisation du citrate comme seule source de carbone.	-la pente du milieu Citrate de Simmons est ensemencée par une strie longitudinale. -mettre à l'étuve 24 heures à 37°C. -Virage de la couleur du milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) : résultat positive, la bactérie utilise le citrate.	Delarras, 2000
VP (voges Proskauer)	- La production de l'acétoïne. -La réaction de voges proskauer (VP) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butane diol et l'acétoïne.	-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24h. Après culture : -Ajouter 2 à 3 gouttes de VPI (alpha naphтол) et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VPII (une solution de soude) : -Milieu rouge : VP(+) . -Milieu jaune : VP(-) .	Delarras, 2003

La suite du tableau 05:

RM (rouge de méthyle)	Mise en évidence de la voie des fermentations acides mixtes.	<p>-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs.</p> <p>-Incuber à 37°C pendant 48 h.</p> <p>-Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle.</p> <p>-La lecture est immédiate :</p> <p>-Milieu rouge : RM (+).</p> <p>-Milieu jaune : RM(-).</p>	Delarras, 2003
Mannitol mobilité	-Dégradation du mannitol La mobilité	<p>-Ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit.</p> <p>-Incuber à 37° C pendant 24 h</p> <p><u>-Caractère mannitol</u> : Apparition de couleur jaune.</p> <p><u>-La mobilité</u> : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la piqure).</p>	Guiraud, 2003
Urée Indole	-Uréase -Formation d'indole	<p>-Faire une suspension en milieu Urée-indole.</p> <p>- Incuber à 37° C pendant 24h.</p> <p>-Uréase(+) : Apparition de couleur rose</p> <p>-Indole(+):Après l'ajout du réactif de Kowacs, apparition d'un anneau rouge à la surface.</p>	Delarras, 2003
ONPG	β-galactosidase	<p>-Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée.</p> <p>-Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.</p> <p>-incuber 30 min à 37°C</p> <p>-virage de couleur du milieu au jaune : ONPG (+)</p>	Delarras, 2003

- **Galerie biochimique miniaturisé API 20E :**

Principe :

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée.

Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture (Voir AnnexeII) et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification [17].

Technique :**Préparation de la galerie :**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures [17].

Lecture :

Les Réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

- Test VP : VPI + VP II, attendre 10 min, une couleur rose-rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : Réactif TDA, une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- Test IND : Réactif de Kovacs, attendre 2 mn, Anneau rouge.
- Test NO₂: NIT I + NIT II, attendre 2-3 mn, une couleur rouge.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification (Guiraud, 2003).

Le code numérique obtenu permet d'identifier la souche étudiée en se référant au catalogue analytique, soit avec un logiciel d'identification.

5.2.2. Staphylocoques: (schéma02)

Ce sont des coques à Gram positifs, immobile, en générale groupés en amas dans un plan irrégulier, mais on peut les rencontrer également sous forme de diplocoques, en tétrades, ou en courtes chainettes [18].

a. Isolement :

- L'isolement sélectif des Staphylocoques a été réalisé sur la gélose Chapman qui contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75 g.L⁻¹), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl.
- L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation.

On peut étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies (Rodier, 1996).

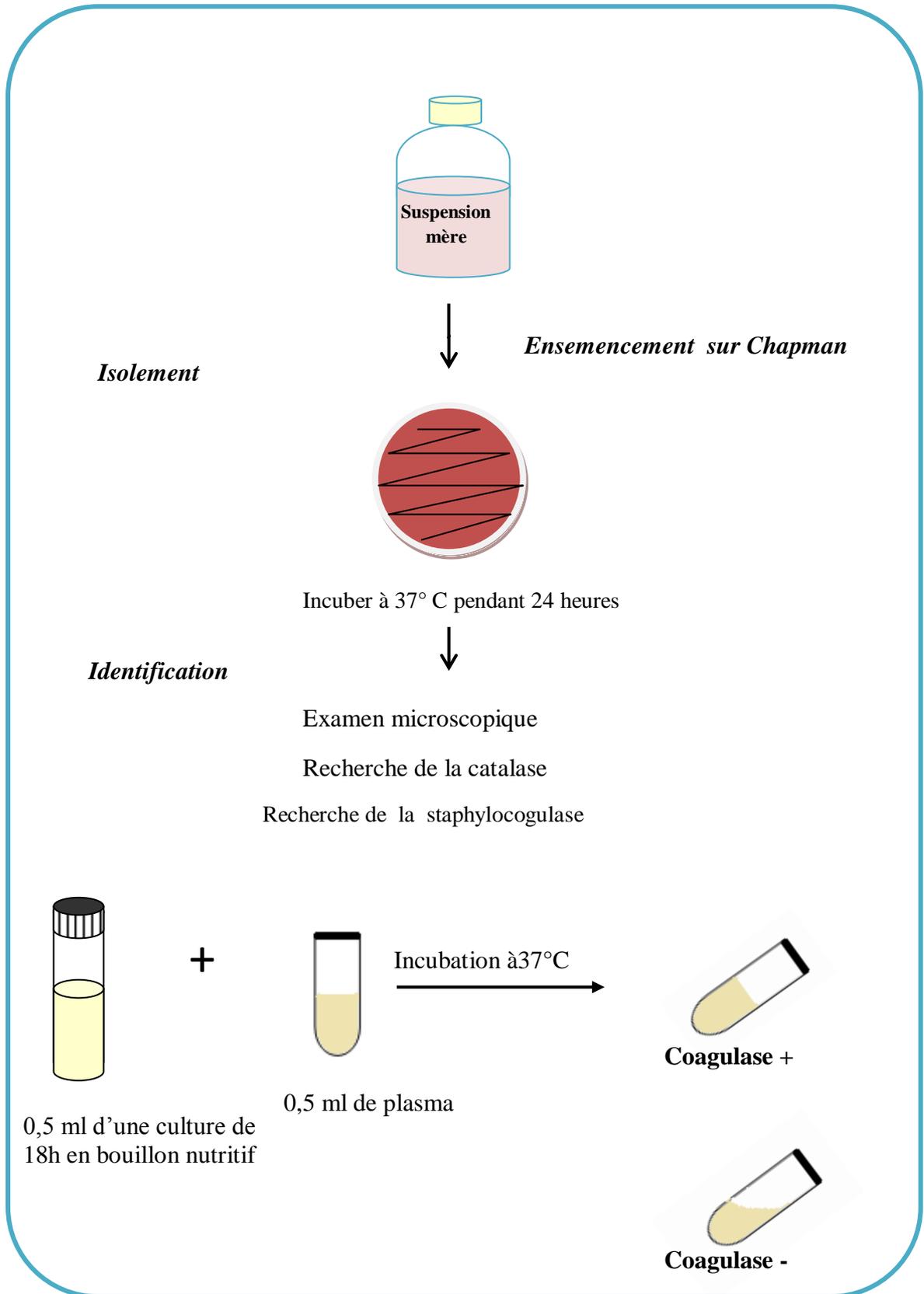


Schéma 02: Recherche des Staphylocoques pathogènes (Rodier, 1996).

b. Identification :

- **Examen macroscopique :** les colonies pigmentées en jaunes et entourées d'une auréole jaune : forte suspicion de *Staphylococcus aureus*. Les autres espèces de Staphylocoques donnent généralement des colonies plus petites, rosées et n'entraînent pas de virage du milieu (Rodier, 1996).
- **Examen microscopique :** Ce sont des cocci Gram positive, regroupés en amas (grappe de raisin).
- **Recherche de la catalase :**

Principe :

Cette enzyme empêche en effet l'accumulation d' H_2O_2 et le dégrade selon la Réaction suivante :



Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram + (Rodier, 1996).

Techniques :

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes,
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.
- Surveiller l'apparition d'un dégagement d'oxygène sous forme de bulles gazeuses (Rodier, 1996).

Lecture :

- Dégagement immédiat de bulles gazeuses: test catalase est positif.
- Pas de dégagement de bulles gazeuses: test catalase est négatif (Rodier, 1996).

Recherche de la Staphylocoagulase :

La recherche de la Staphylocoagulase in vitro est mise en évidence par la capacité de cette enzyme à coaguler le plasma de lapin dans un délai de 24 h (Rodier, 1996).

Cette recherche constitue un critère taxonomique important pour l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* (Rodier, 1996).

Techniques :

- Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma de lapin (ou de l'homme) + 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon nutritif de la souche à étudier.
- Placer le mélange à 37°C.
- Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures (Rodier, 1996).

Lecture :

- Coagulation du plasma : test Coagulase est positif : la souche est *Staphylococcus aureus*.
- Pas de coagulation du plasma : test Coagulase est négatif : la souche n'est pas une *S. aureus* (Rodier, 1996).

En se basant sur les tests : coagulase, catalase et le mannitol, nous pouvons différencier entre les espèces du genre *Staphylococcus* selon le tableau suivant :

Tableau 06: Tableau d'identification des staphylocoques [18].

<i>Staphylocoques</i>	<i>aureus</i>	<i>intermedius</i>	<i>epidermidis</i>	<i>saprophyticus</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	-	-	-
Mannitol	+	-	+/- ₋	+

- **Etude des caractères biochimiques par la galerie API Staph :**

Principe et mode opératoire :

Le principe et la préparation de la galerie API Staph, ainsi que la préparation de l'inoculum sont similaires à ceux décrites pour la galerie API 20E.

Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur en évitant la formation de bulles.
- Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.
- Incuber 24 heures à 37°C [18].

Lecture :

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de lecture de la galerie miniaturisé API Staph (Annexe II) [17].

Identification :

L'identification des espèces est réalisée de la même manière que la galerie API 20E.

5.2.3. Les streptocoques fécaux (schéma 03):

Les streptocoques sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Les streptocoques du groupe Dou fécaux sont considérés comme un bon indicateur spécifique de la contamination fécale (Bouchaala, 2010). Ils sont parfois à l'origine de septicémie et d'endocardite (infection et inflammation de la paroi de l'intérieur du cœur). Ils peuvent également être responsables d'infections urinaires qui, le plus souvent, sont résistantes aux antibiotiques.

a. Isolement :

- Ensemencer le bouillon Rothe (c'est un milieu contenant l'agent sélectif l'azide de sodium qui inhibe la flore secondaire Gram négatif) avec 1 ml de la solution mère et de ses dilutions décimales (1/10, 1/100 et 1/1000).
- Incuber à 37°C pendant 24h.
- Les tubes présentant un trouble microbien après la période d'incubation seront susceptibles de contenir des streptocoques fécaux, ils doivent subir un test confirmatif (Larpen, 1997) par ensemencement sur le bouillon Eva-Litsky qui renferme en plus

de l'azide de sodium une faible concentration de cristal violet qui freine le développement des bactéries Gram positif (Degremont, 2005).

- incubés à 37°C pendant 24h.
- Les cultures positives (dépôt violet sur Eva-Litsky) sont repiquées sur la gélose nutritive.

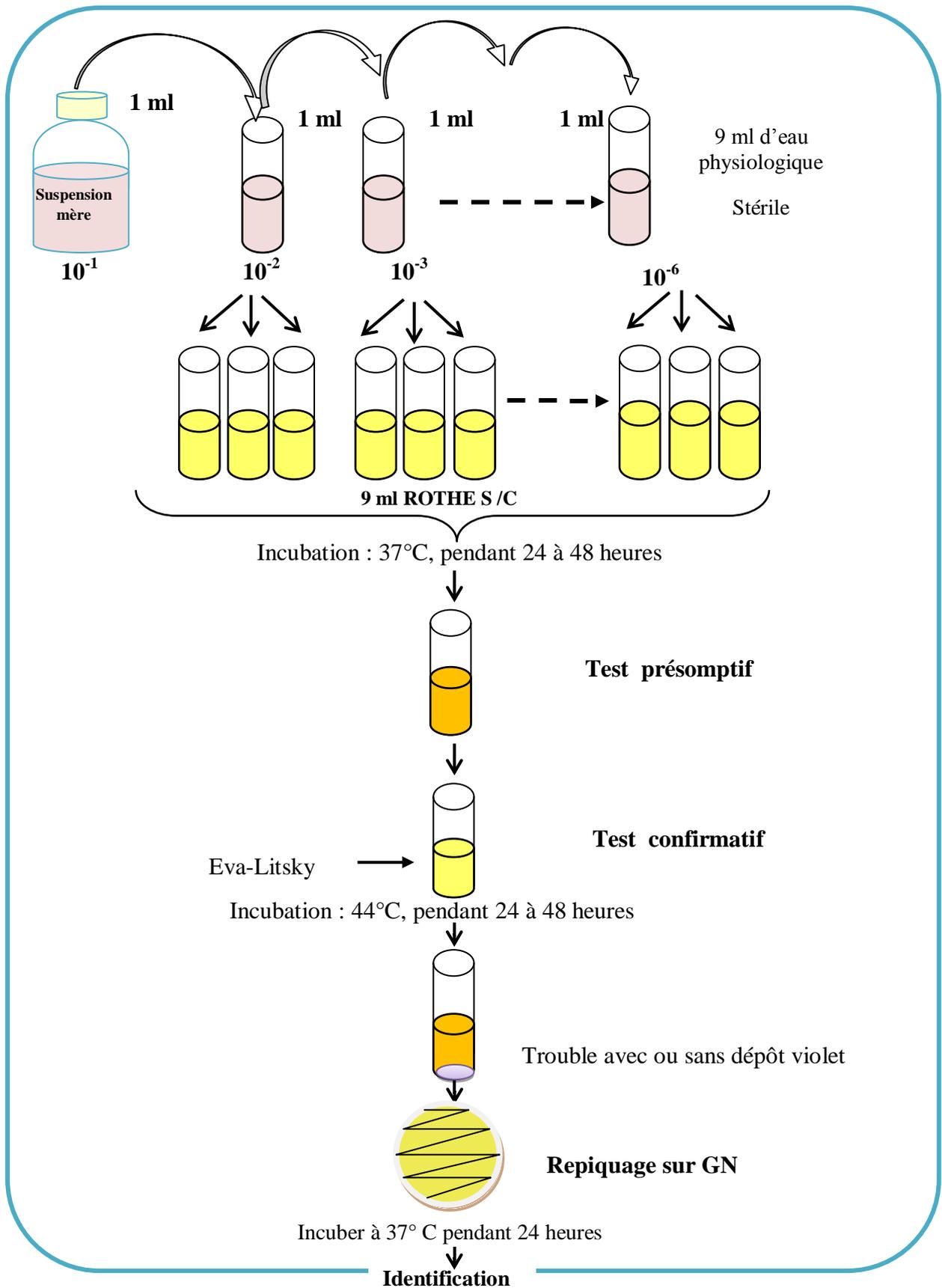


Schéma 03 : Recherche des streptocoques fécaux (Larpen, 1997).

b. Identification :

- **Aspect microscopique :** Sont des coques Gram positifs ronds ou ovoïdes, groupés en chaînettes plus ou moins longues ou en diplocoques.
- **Test catalase**

Afin de différencier entre les staphylocoques et les streptocoques, on réalise le test catalase (déjà décrit pour l'identification des Staph). Les streptocoques sont caractérisés par l'absence de la catalase (Joffin et Leyrol, 2003).

➤ Etude des caractères biochimique par la galerie API 20 Strep :

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques, qui représentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques et entérocoques [19].

Mode opératoire :

Après isolement et vérification de l'appartenance de la souche à identifier à la famille des *Streptococcaceae* (coloration de Gram, catalase), l'inoculation de la galerie API20 Strep s'effectue selon les étapes suivantes :

- Ouvrir une ampoule d'API suspension Medium (2ml), à l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
- Réaliser une suspension très dense.
- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles :
 - Pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule.
 - Pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (test RIB à GLYG).
- Ouvrir une ampoule d'API GP Medium, et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum, bien homogénéisé.
- Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH à GLYG en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Renfermer la boîte d'incubation.

- Incuber à $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose pendant 4h - 4h30 pour une première lecture et 24 heures si nécessaire pour une deuxième lecture [19].

Lecture :

Ajouter les réactifs :

- Test VP : 1 goutte de VP1 et VP2.
- Test HIP: 2 gouttes de NIN.
- Test PYRA, GAL, GUR, GAL, PAL, LAP: 1 goutte de ZYM A et ZYM B.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Annexe II) [19].

Identification :

Identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification.

5.2.4. Vibrions cholériques : (Schéma04)

Les Vibrions se présentent sous forme de Bacilles Gram Négatifs droits ou incurvés, très mobiles, possédant une oxydase, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose sans production de gaz ni d' H_2S .

a- Isolement :**• Enrichissement :**

- Ajouter 1 ml de la suspension à analyser dans un tube de 10 ml de l'eau peptonée alcaline (EPA : milieu d'enrichissement).
- Incuber à 37°C pendant 3 heures.
- Après incubation, prélever en surface une anse de culture et ensemer un autre tube contenant 10 ml EPA.
- Incuber à 37°C pendant 3 heures.
- Procéder à un troisième ensemencement de même type si les possibilités d'horaires le permettent (Delarras, 2000).

• Isolement (proprement dite):

- Ensemer une boîte de GNAB (Gélose Nutritive Alcaline et Biliée) ou GN à $\text{pH}=8$ à partir du dernier milieu d'enrichissement.
- Incuber à 37°C pendant 24 h (Delarras, 2000).

b- Identification :

- **Aspect macroscopique :** Les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosse colonies lisses et transparentes caractéristique sur la gélose ensemencée (Delarras, 2000).
- **Aspect microscopique :** Etat frais (bacilles, mobiles), et coloration de Gram (bacilles Gram négatifs).
- Test oxydase : les vibrions sont Oxydase (+).
- Tests biochimiques : classiques ou de préférence une API20E (comme déjà citer pour les entérobactéries) (Delarras, 2000).

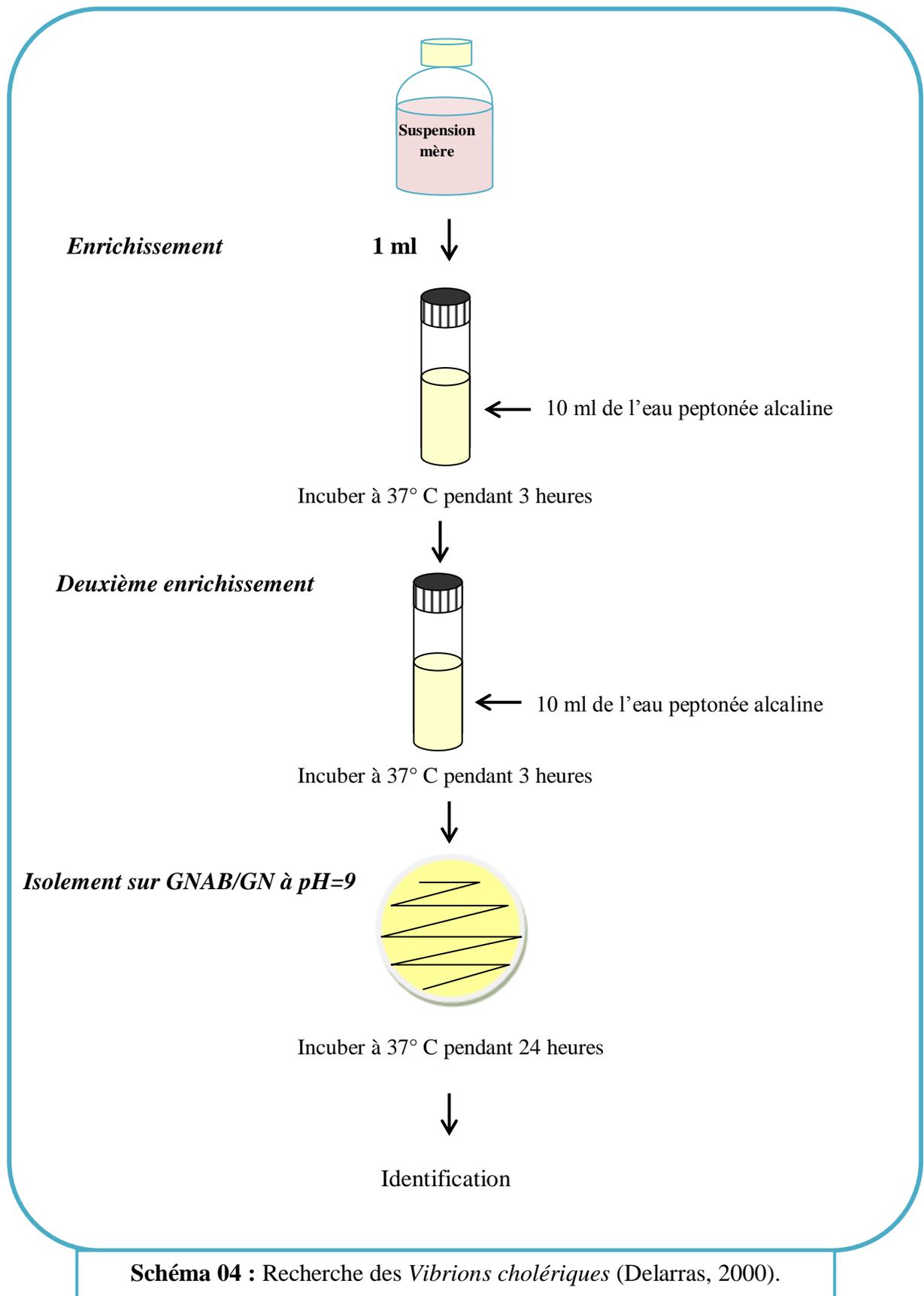


Schéma 04 : Recherche des *Vibrions cholériques* (Delarras, 2000).

5.2.5. *Pseudomonas* :(schéma 05)

a. Isolement :

- L'isolement du genre *Pseudomonas* a été réalisé sur la gélose cétrimide. La gélose au cétrimide est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P.aeruginosa*. Sur ce milieu de très nombreuses bactéries sont inhibées de par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N-triméthylammonium). ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif) [24].
- L'incubation se fait à 37° C pendant 24 h (Delarras, 2000).

b. Identification :

- **Examen macroscopique :** sur la gélose cétrimide, les colonies de *Pseudomonas* apparaissent souvent de tailles moyennes, à bord irrégulières, lisses et bombées (elles sont souvent pigmentées en vert du fait de la production des pigments [24].
- **Examen microscopique :** état frais (mobile grâce à des flagelles polaires) et coloration de Gram (bacille à Gram négatif).
- **Recherche de l'oxydase :** les *Pseudomonas* sont oxydase positif.
- **Tests biochimiques :** par galerie classique ou API 20E (selon la disponibilité) (Delarras, 2000).
- **Recherche de la pyoverdine et la pyocyanine :**

Technique :

- A partir d'une culture sur cétrimide (faire une suspension en eau distillée stérile), ensemencer deux milieux gélosés : King A et King B.
Le milieu King A est destiné à favoriser sélectivement la synthèse de la pyocyanine (pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique).
Le milieu King B est destiné à favoriser la synthèse du pigment jaune-vert fluorescent (pyoverdine) par le bacille pyocyanique et divers autres *Pseudomonastel* que : *Pseudomonas fluorescens*.
- Les milieux sont inoculés par une strie médiane.
- L'incubation se fait à 37° C pendant 1 à 4 jours (Delarras, 2000).

Lecture :

- Couleur bleue sur le milieu King A : présence de pyocyanine.
- Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B sous UV : présence de pyoverdine (Delarras, 2000).

Remarque : En cas de doute pour la production de la pyocyanine, verser 0.5 ml de chloroforme à la surface de la culture sur le King A et laisser les tubes inclinés pendant 10 à 15 minutes. La pyocyanine est soluble dans le chloroforme coloré celui-ci en bleu (Rodier et *al.*, 2005).

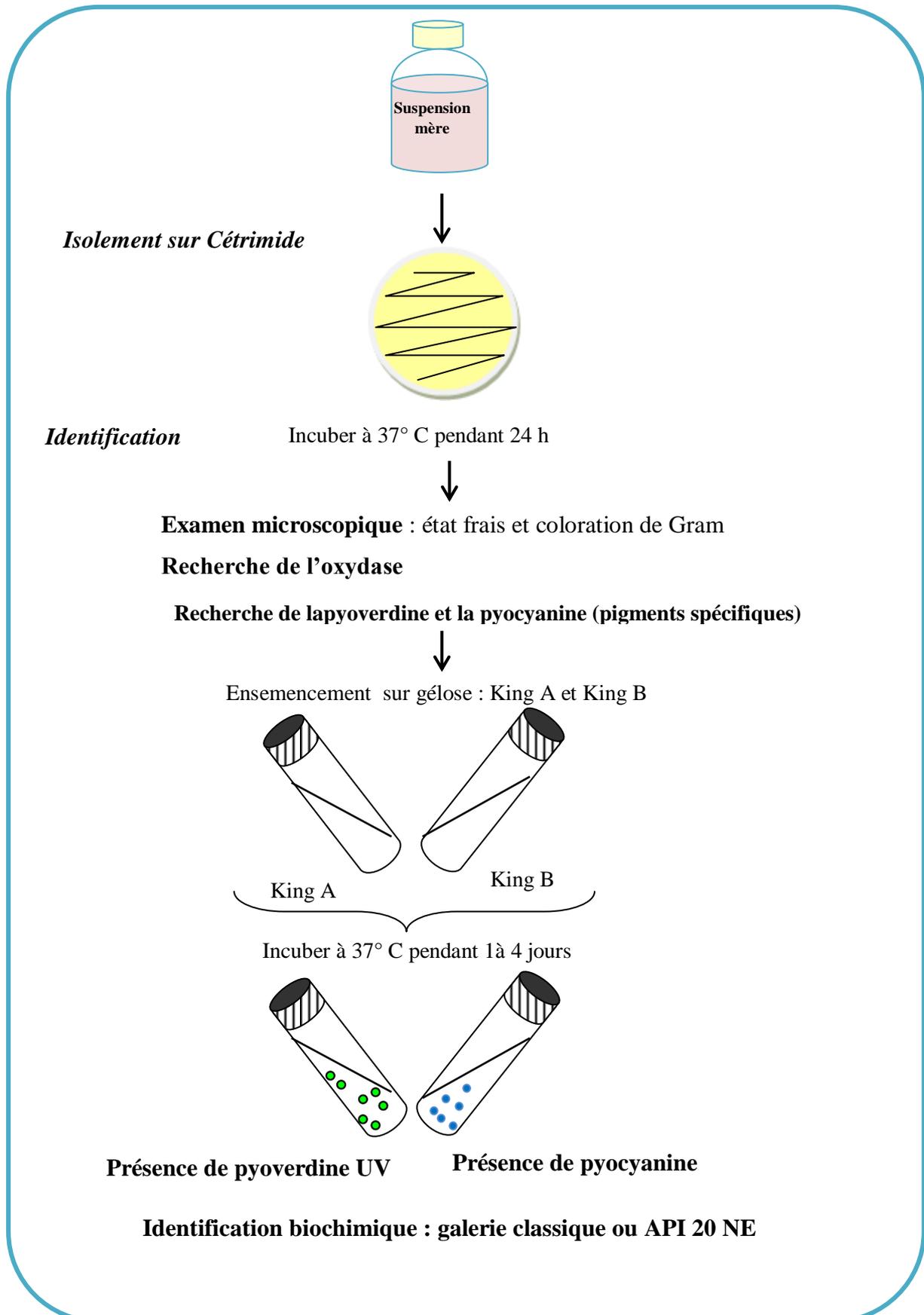


Schéma 05 : Isolement et identification de *Pseudomonas* (Delarras, 2000).

5.2.6. *Aeromonas*: (schéma 06)

Bactéries en forme de bacilles, extrémités arrondies, Gram négatif. Ce sont des aéroanaérobies facultatifs, positifs au test à l'oxydase et parfois mobiles (Chernine, 2010).

a. Isolement :

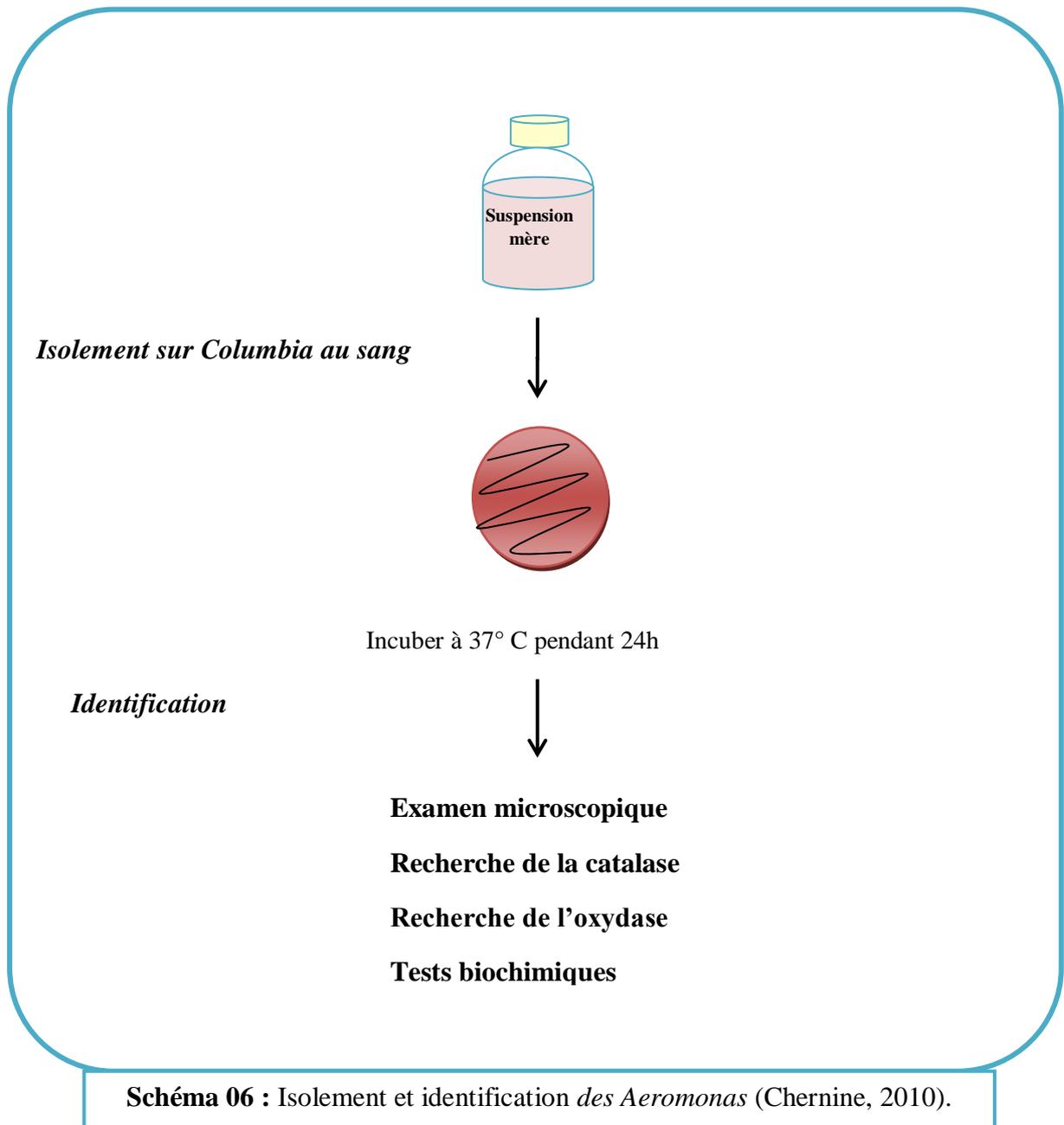
Dans notre étude, les *Aeromonas* ont été recherché par ensemencement de la gélose au sang humain pendant 24h à 37°C.

b. Identification :

• Examen macroscopique :

Les *Aeromonas* se présentent le plus souvent sous forme de colonies moyennes, plates, blanchâtre, et souvent β hémolytique (Chernine, 2010).

- **Examen microscopique** : état frais (mobile grâce à des flagelles polaires) et coloration de Gram (bacille à Gram négatif).
- **Recherche de l'oxydase** : les *Aeromonas* sont oxydase positif.
- **Recherche de la catalase** : les *Aeromonas* sont catalase positif.
- **Tests biochimiques** : par galerie classique (TSI, Mannitol, Urée-indol, Nitrate réductase) et API 20 NE (selon la disponibilité) (Delarras, 2000).



❖ Api 20NE :

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif nonentéro bactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation (voir Annexe II) [20].

Mode opératoire :

- Est le même que la galerie API 20E.

Préparation de l'inoculum :

- Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule d'API NaCl 0.85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé [20].

Inoculation de la galerie :

- Remplir uniquement les tubes des tests NO₃ à PNPG,
- Créer une anaérobiose dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Remplir les tubes et les cupules des tests : GLU à PAC avec la suspension bactérienne.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures [20].

Lecture :

Les Réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

- Test NO₃: NIT I + NIT II.
- Test TRP : Réactif de Kovacs.

Sur la fiche de résultat, déterminer le profil numérique (catalogue analytique) [20].

Identification

- L'identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification.

6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques :

Les bactéries identifiées sont testées vis-à-vis de 8 antibiotiques sur milieu gélosé :

✓ Technique de l'antibiogramme :

L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose (gélose Mueller Hinton) à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations de Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2013).

✓ Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort [21].

✓ Ensemencement de la gélose de l'antibiogramme:

La gélose utilisée est la gélose Mueller Hinton (MH), son ensemencement a été effectué dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum selon les étapes suivantes [22]:

- Couler la gélose MH en boîtes de Pétri, Laisser sécher et solidifier avant utilisation.
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 30 minutes avant application des disques d'antibiotiques [22].

✓ Application des disques d'antibiotique :

Les antibiotiques qui ont été testés vis-à-vis des bactéries isolées sont représentés dans le tableau 07.

Chaque disque d'antibiotique a été appliqué sur gélose ensemencé par une culture bactérienne (de chaque espèce) à l'aide d'une pince stérile [22].

Remarque:

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90mm, et de ne pas déplacer les disques après application [21].

✓ Condition d'incubation : Incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- classer la bactérie dans l'une des catégories S (sensible), R (résistante) ou I (intermédiaire).

Remarque : Comme témoins nous avons utilisés des souches de références :

- *E.coli* ATCC 25922 pour l'antibiogramme des entérobactéries.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour l'antibiogramme des *Staphylococcus*.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pour l'antibiogramme des *Pseudomonas*.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pour l'antibiogramme des enterocoques.

Les limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) des souches de références utilisées sont représentées dans le tableau 07 (Annexe II).

Tableau 07: Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme [33].

Antibiotique	Classe	Chargede disque	Sigle
Famille de Bêta-lactamines			
Pénicilline	Pénicilline G	10µg	P
Pénicilline	Amoxiciline	30µg	AMC
Famille de Phenicoles			
Chloramphénicol	Phenicoles	30µg	C
Famille de Tétracyclines			
Tétracycline	Tétracyclines	30UI	TE
Famille de Macrolides			
Erythromycine	Macrolides	15UI	E
Lincomycine	Lincosamides	10µg	L
Glycopeptide			
Vancomycine	Glycopeptide	30µg	VA
Divers			
Bacitracine	Polypeptides	8µg	B

I. Résultats:

1. Résultats de l'examen macroscopique des poissons :

Les résultats de l'examen externe des poissons (P % : Prévalence des poissons atteints) au niveau des trois points de prélèvement (S1, S2, et S3) durant notre période d'étude (Février : P1 et Mars: P2) sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 08: Les valeurs de prévalence des lésions externes des carassins
Carassius carassius peuplant le canal Messida

Période de prélèvement	point de prélèvement	Nombre de poisson examiné	Prévalence des poissons atteints (%)	Qualité de l'eau et de l'habitat	Classe Agence de l'eau
P1 : 22/02/2015	S1	12	16.66 %	Médiocre	2
	S2	13	15.38 %	Médiocre	2
	S3	15	13.33 %	Médiocre	2
P2 : 10/03/2015	S1	10	30 %	Mauvaise	3
	S2	14	21.43 %	Mauvaise	3
	S3	11	18.18 %	Médiocre	2

La prévalence globale (P%) de poissons atteints de lésions externes est égale à 18.66%. La valeur de P la plus élevée a été enregistrée durant la deuxième période d'étude (Mars) au niveau du point S2.

2. Résultats de détermination du sexe et du poids des poissons :

Au niveau de chaque point de prélèvement 2 à 3 individus ont été examinés. Les résultats des poids et de pH (moyenne \pm écartype) des poissons de chaque prélèvement sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Résultats de détermination du sexe et du poids des carassins *Carassius carassius* étudiés.

Période de prélèvement	point de prélèvement	poids	Sexe
P1 : 22/02/2015	S1	300.5±52.04	Femelle
	S2	290.95±134.85	Femelle
	S3	309.65±102.74	Mâle
P2 : 10/03/2015	S1	362.25±159.88	Femelle
	S2	396.4±166.31	Mâle
	S3	396.4±166.31	Femelle

3. Résultats représentant les valeurs de pH des différentes parties de corps du poisson :

Tableau 10 : valeurs de pH des parties étudiées.

Période de prélèvement	point de prélèvement	pH		
		mucus	branchie	Chair
P1 : 22/02/2015	S1	8.00±0.01	8.09±0.02	7.99±0.01
	S2	7.10±0.01	8.09±0.04	7.9± 0.14
	S3	7.89±0.02	8.19±0.01	8±0.14
P2 : 10/03/2015	S1	7.15± 0.07	7.21±0.02	7.47± 0.05
	S2	7.29±0.02	7.37±0.05	7.00± 0.13
	S3	7.34±0.05	7.36±0.03	7.32± 0.03

4. Résultats d'isolement et d'identification de la flore bactérienne :

4.1. Les entérobactéries :

➤ **Résultats des examens macroscopique et microscopique :**

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes qui ont été cultivées sur les différents milieux de culture utilisés pour la recherche des entérobactéries sont représentés dans le tableau (11).

Tableau 11 : Aspect macroscopique et microscopique des colonies des entérobactéries isolées du carassin commun peuplant le canal Messida.

Période de prélèvement	point de prélèvement	Gélose	Patrie du corps	Observation macroscopique	Observation microscopique
P1 : 22/02/2015	S1	Hektoen	Chair	- colonies moyennes, marrons, bombées, brillantes, à contours réguliers (Fig.8).	-Bacilles en chaînettes, Gram négatif.
			branchie	- colonies moyennes, orangés, à contours réguliers, bombées, muqueuses, brillantes (Fig.9).	-Bacilles en chaînettes, Gram négatif.
		SS	Mucus	-colonies moyennes, roses, plates, crémeuses, à contours réguliers (Fig.10).	-Bacilles, Gram négatif.
			Chair	-colonies noires moyennes, plates, crémeuses, à contours réguliers (Fig.11).	-Bacilles, Gram négatif.
	S2	Hektoen	Branchie	-colonies vertes à centres noirs, petites, à contours réguliers (Fig.12).	-Bacilles, Gram négatif.
			SS	mucus	-colonies moyennes, rouges briques, bombées, brillantes (Fig.13).
					-colonies moyennes, incolores, à centres noirs, plates, crémeuses (Fig.14).

Suite du tableau 11 :

			Chair	-colonies moyennes, incolores, bombées, lisses, brillantes, à contours réguliers (Fig.15).	-Bacilles, Gram négatif.
	S3	Hektoen	Branchie	-colonies moyennes, rouges, muqueuses, lisses, brillantes, à contours réguliers (Fig.16).	-Bacilles en chaînettes, Gram négatif.
		SS	Mucus	-colonies roses moyennes, à centres noirs, crémeuses, à contours réguliers (Fig.17).	- Bacilles, Gram négatif.
P 2 : 10/03/2015	S1	Hektoen	Branchie	-colonies orangées petites, plates, à contours réguliers, virage de milieu (Fig.18).	- Bacilles, Gram négatif.
		SS	Chair	-colonies rouges briques rondes à contours réguliers (Fig.19).	-Bacilles, Gram négatif.
		Mac conkey	Branchie	-colonies blanchâtres petites à contours réguliers, bombées, brillantes, crémeuses, Virage de milieu vers le jaune.	- Bacilles, Gram négatif.
	S2	Hektoen	branchie	-Colonies vertes petites, à centres noir, plates, crémeuses (Fig.20).	- Bacilles en chaînettes, Gram négatif.
		SS	Branchie	colonies rouges briques rondes à contours réguliers(Fig.21).	- Bacilles, Gram négatif.

Suite du tableau 11:

		Mac conkey	Chair	-colonies blanchâtres bombées, brillantes, crémeuses (Fig.22).	- Bacilles, Gram négatif.
S3	Hektoen	Mucus		-colonies rouges briques, rondes à contours réguliers, brillantes (Fig.23).	- Bacilles, Gram négatif.
		Chair		-colonies marrons moyennes, à contours réguliers, plates (Fig.24).	- Bacilles, Gram négatif.
	SS	Mucus		-colonies incolores petites à contours réguliers, bombées, crémeuses (Fig.25).	- Bacilles, Gram négatif.



Figure 08 : Colonies marron sur la gélose Hektoen



Figure 09: Colonies orangées sur la gélose Hektoen



Figure 10: Colonies roses sur la gélose SS

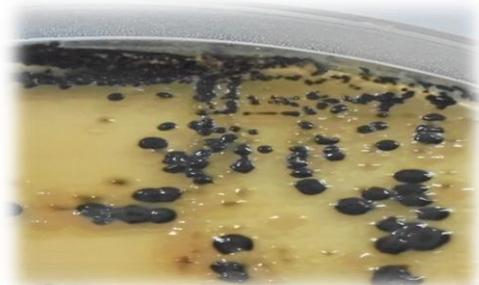


Figure 11: Colonies noires sur la gélose SS



Figure 12: Colonies vertes à centre noir
Sur la gélose Hektoen



Figure 13: Colonies rouges briques sur la
la gélose SS

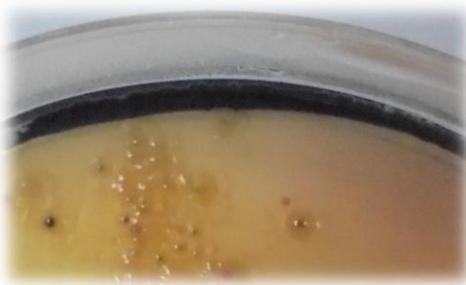


Figure 14: Colonies incolores à centre noir
sur la gélose SS

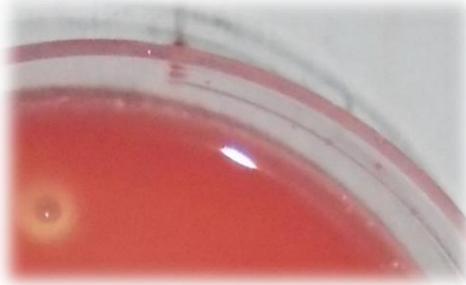


Figure 15: Colonies incolores sur
la gélose SS

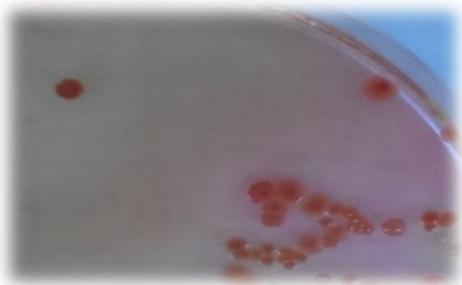


Figure 16: Colonies rouges sur la gélose
Hektoen



Figure 17: Colonies roses à centres noirs
sur la gélose SS



Figure 18: Colonies orangées sur la gélose Hektoen



Figure 19: Colonies rouges briques sur la gélose SS



Figure 20: Colonies vertes à centres noirs sur la gélose Hektoen



Figure 21: Colonies rouges briques sur la gélose SS



Figure 22: Colonies blanchâtres sur la gélose Mac conkey



Figure 23: Colonies rouges brique sur la gélose Hektoen

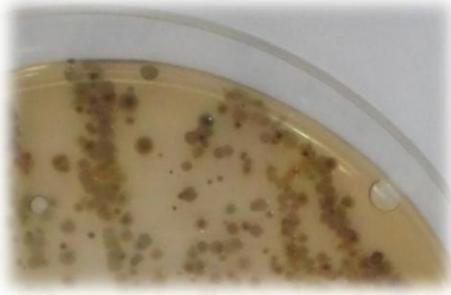


Figure 24: Colonies marrons sur la gélose

Hektoen



Figure 25: Colonies incolores sur la

gélose SS

➤ **Résultats de l'identification des entérobactéries :**

L'étude des caractères cultureux et biochimiques des bactéries qui ont été poussées sur les géloses Mac Conkey, Hektoen et SS, nous a permis d'identifier 19 entérobactéries :

Tableau 12 : Résultats de l'identification des entérobactéries.

Période de prélèvement	Points de prélèvement	Partie du corps	Gélose	Bactéries identifiées
P1 : 22/02/2015	S1	Chair	Hektoen	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Branchie	Hektoen	<i>Pantoea spp.</i>
		Mucus	SS	<i>Citrobacter braakii</i>
		Chair	SS	<i>Salmonella choleraesuis spp arizonae</i>
	S2	Branchie	Hektoen	<i>Escherichia coli 1</i>
		Mucus	SS	<i>Escherichia vulneris</i>
		Mucus	SS	<i>Hafnia alvei</i>
		Chair	SS	<i>Salmonella spp. (Sa1)</i>
	S3	Branchie	Hektoen	<i>Serratia ficaria</i>
		Mucus	SS	<i>Citrobacter freundii</i>
P2 : 10/03/2015	S1	branchie	Hektoen	<i>Raoultella terrigena</i>
		Chair	SS	<i>Klebsiella pneumoniae spp ozaenae</i>
		Branchie	Mac conkey	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	S2	Branchie	Hektoen	<i>Salmonella spp. (Sa2)</i>
		Branchie	SS	<i>Proteus mirabilis</i>
		Chair	Mac conkey	<i>Salmonella spp. (Sa3)</i>
S3	Mucus	Hektoen	<i>Pantoea spp.2</i>	
	Chair	Hektoen	<i>Serratia odorifera1</i>	
	Mucus	SS	<i>Kluyvera spp.</i>	

- **Résultats de la recherche des enzymes respiratoires :**

Les résultats des tests catalase, oxydase et nitrate réductase des entérobactéries sont mentionnés dans le tableau 13.

Tableau 13 : les résultats de la recherche des enzymes respiratoires des entérobactéries isolées du *Carassius carassius* peuplant le canal Messida.

Test Germe identifié	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	/
<i>Pontoea</i> spp.	+	-	/
<i>Citrobacter braakii</i>	+	-	/
<i>Salmonella choleraesuis</i> spp <i>arizonae</i>	+	-	/
<i>Escherichia coli</i> 1	+	-	/
<i>Escherichia vulneris</i>	+	-	/
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	/
<i>Salmonella</i> spp. (Sa1)	+	+	/
<i>Serratia ficaria</i>	+	-	/
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	/
<i>Raoultella terrigena</i>	+	/	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i>	+	/	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	+	-
<i>Salmonella</i> spp. (Sa2)	+	/	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-
<i>Salmonella</i> spp. (Sa3)	+	+	-
<i>Pontoea</i> spp.2	+	/	-
<i>Serratia odorifera</i> 1	+	/	-
<i>Kluyvera</i> spp.	+	/	-

(+) : Résultat positive (-) : Résultat négatif (\) : non effectuée

- **Résultat de l'identification biochimique :**

❖ Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique des différentes souches des entérobactéries sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Résultats des tests biochimiques classiques des entérobactéries isolées du *Carassius carassius* peuplant le canal Messida

Test Germe identifié	TSI				Citrate de Simmons	Mannitol mobilité		Urée indole		Clark et Lubs		ONPG
	H ₂ S	Gaz	Glu	Lac		MAN	MOB	URE	IND	VP	RM	
<i>Proteus mirabilis</i> (Fig. 26)	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Salmonella</i> spp. (Sa3) (Fig. 27)	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>Pantoea</i> spp.2 (Fig. 28)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> (Fig. 29)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Serratia ficaria</i> (Fig. 30)	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> 1 (Fig. 31)	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négatif

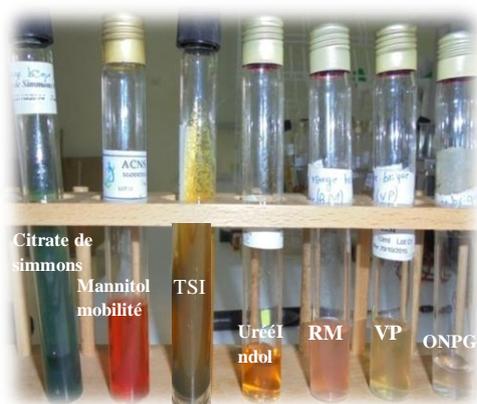


Figure 26: Résultats de la galerie biochimique Classique pour *Proteus mirabilis*.



Figure 27: Résultats de la galerie biochimique classique pour *Salmonella* spp. (Sa3)

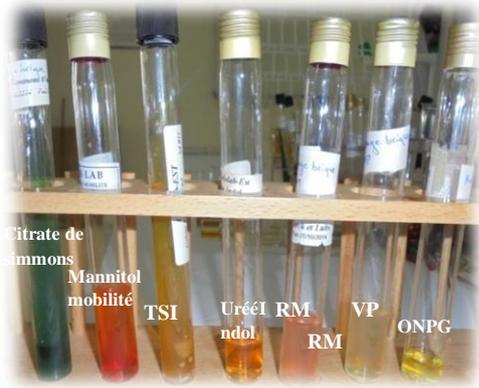


Figure 28: Résultats de la galerie biochimique classique pour *Pontoea* spp. 2

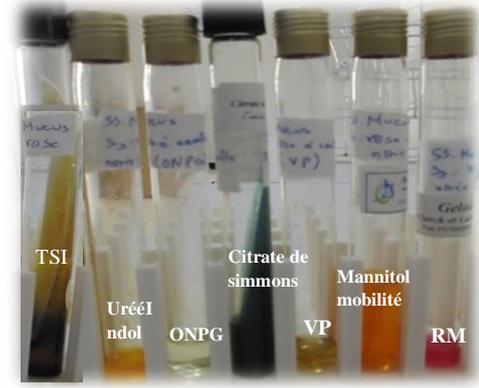


Figure 29: Résultats de la galerie biochimique classique pour *Citrobacter freundii*.

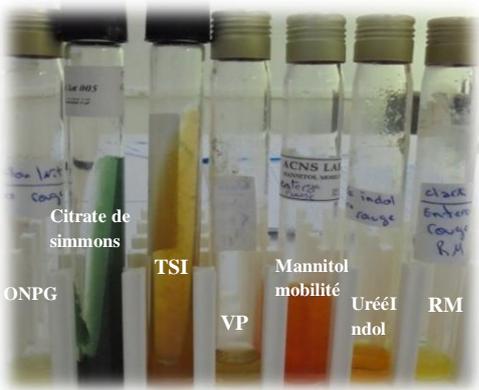


Figure 30 : Résultats de la galerie biochimique classique pour *Serratia ficaria*.

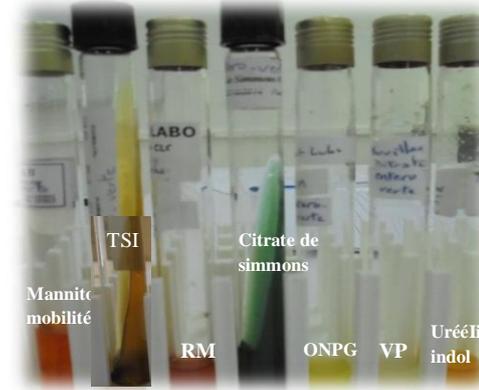


Figure 31: Résultats de la galerie biochimique classique pour *Escherichia coli*.

❖ Les résultats de l'identification de certaines espèces des entérobactéries par l'API 20E sont les suivants :



Figure 32: Profil biochimique d'*Enterobacter cloacae*.



Figure 33: Profil biochimique de *Pontoea* spp.



Figure 34: Profil biochimique de *Citrobacter braakii*.



Figure 35: Profil biochimique de *Salmonella choleraesuis* spp *arizonae*.



Figure 36: Profil biochimique d'*Escherichia vulneris*.



Figure 37: Profil biochimique de *Hafnia alvei*.



Figure 38: Profil biochimique de *Salmonella* spp. (Sa1)



Figure 39: Profil biochimique de *Raoultella terrigena*.



Figure 40: Profil biochimique de *Klebsiella pneumoniae spp ozaenae*.



Figure 41: Profil biochimique d'*Enterobacter sakazakii*.



Figure 42: Profil biochimique de *Salmonella spp. (Sa2)*



Figure 43: Profil biochimique de *Serratia odorifera1*.



Figure 44: Profil biochimique de *Kluyvera spp.*

4.2. les vibrions cholériques :

A partir des prélèvements effectués nous avons isolé deux souches de *Vibrio* :

- *Vibrio fluviatis* à partir des branchies des carassins communs pêchés du point de prélèvement S1 pendant le mois de Février.
- *Vibrio alginolyticus* à partir des branchies des carassins communs pêchés du point de prélèvement S3 pendant le mois de Mars.

La souche *Vibrio fluviatis* a été isolée sur la gélose GN à pH = 9 par contre la souche *Vibrio alginolyticus* a été isolée sur la gélose Hektoen au cours de la recherche des entérobactéries.

➤ Résultats des examens macroscopique et microscopique :

- L'aspect macroscopique des colonies de *Vibrio fluviatis* qui ont été poussées sur la gélose GN à pH = 9 est le suivant : Colonies moyennes, blanchâtres, bombées, crémeuses, lisses, brillantes, à contours réguliers. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des bacilles à Gram négatif (Fig.45).

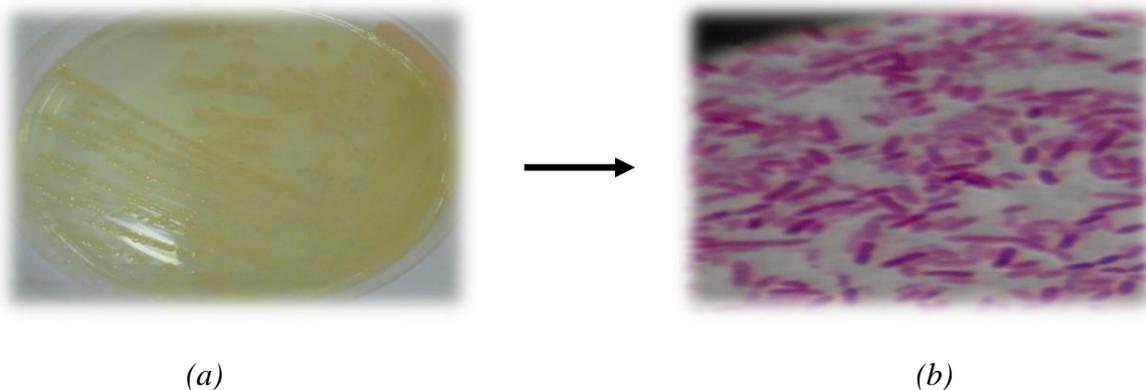


Figure 45: Aspect des colonies de *Vibrio fluviatis*, (a) : colonies blanchâtres sur GN à pH = 9
(b): bacille, Gram négatif ($\times 100$).

Les résultats d'identification biochimique par l'API 20E ont permis de confirmer que les bactéries isolées sur GN à pH = 9 est une *Vibrio fluviatis* (Fig.46).



Figure 46: Profil biochimique de *Vibrio fluviatis*.

- L'aspect macroscopique des colonies de *Vibrio alginolyticus* qui ont été poussées sur la gélose Hektoen est le suivant : Colonies moyennes, vertes, plates, à contours réguliers. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des bacilles à Gram négatif (Fig.47).



Figure 47: Aspect des colonies de *Vibrio alginolyticus*, (a) colonies vertes sur la gélose Hektoen, (b): bacille, Gram négatif ($\times 100$).

Le résultat de l'identification biochimique de *vibrio alginolyticus* par API 20 E est la suivante (Fig.48) :



Figure 48: Profil biochimique de *Vibrio alginolyticus*.

4.3. *Pseudomonas* :

A partir des prélèvements effectués nous avons isolé deux souches de *Pseudomonas* :

- *Pseudomonas luteola* à partir des branchies des carassins communs pêchés du point de prélèvement S1 pendant le mois de Mars.

- *Pseudomonas fluorescens* à partir de la chair des carassins communs pêchés du point de prélèvement S1 pendant le mois de Mars.

La souche *Pseudomonas luteola* a été isolée sur la gélose cétrimide par contre la souche *Pseudomonas fluorescens* a été isolée sur la gélose GN à pH=9.

Remarque : à partir de branchie d'un poisson pêché du point de prélèvement S1 pendant le mois de Février, nous avons identifié à partir de la gélose cétrimide un autre genre bactérien qui est : *Pasteurella* spp. (Bactérie Gram négatif).

➤ **Résultats des examens macroscopique et microscopique :**

- L'aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas luteola* qui ont été poussées sur la gélose cétrimide est le suivant : Colonies petites rondes, réguliers, bombées, crémeuses, brillantes. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des bacilles à Gram négatif (Fig.49).

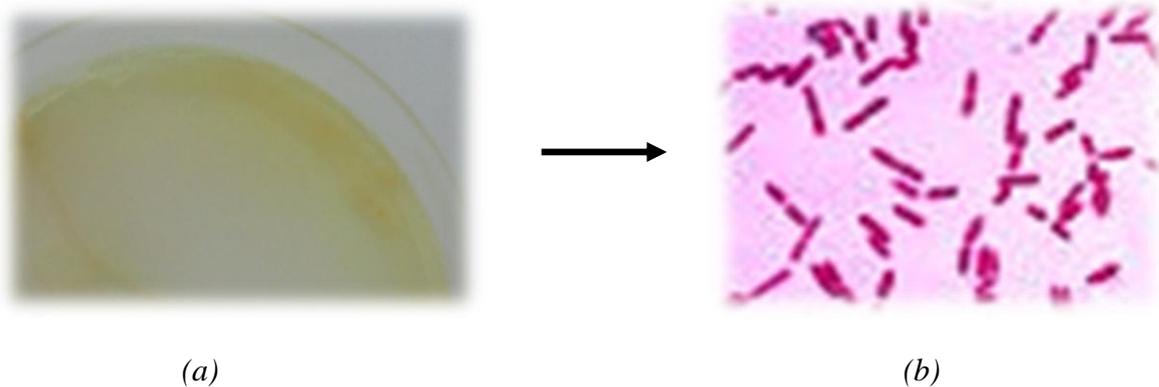


Figure 49: Aspect des colonies de *Pseudomonas luteola* , (a) : diffusion du pigment vert sur Cétrimide, (b) : bacille, Gram négatif (×100).

Le résultat d'identification biochimique par l'API 20 NE a permet de confirmer que la souche isolée sur cétrimide est une *Pseudomonas luteola* (Fig.50).



Figure 50: Profil biochimique de *Pseudomonas luteola*.

- L'aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas fluorescens* qui ont été poussées sur la gélose GN à pH=9 est le suivant : Colonies petites, blanchâtres, plates, crémeuses, à contours réguliers. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des bacilles à Gram négatif (fig.51).

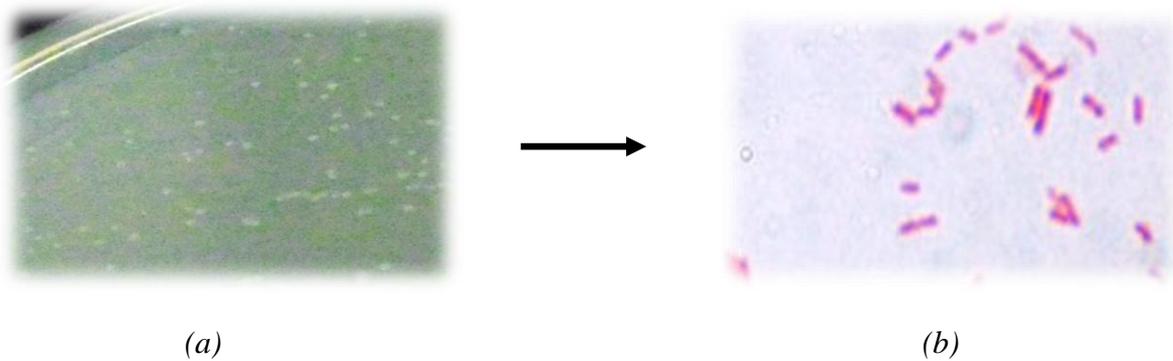


Figure 51: Aspect des colonies de *Pseudomonas fluorescens*, (a) : colonies blanchâtres sur GN à pH = 9, (b) : bacille, Gram négatif ($\times 100$).

Le résultat de l'identification biochimique de *Pseudomonas fluorescens* par API 20 E est la suivante (Fig.52) :



Figure 52: Profil biochimique de *Pseudomonas fluorescens*.

- L'aspect macroscopique des colonies de *Pasteurella* spp. qui ont été poussées sur la gélose Cétrimide est le suivant : Colonies petites, blanchâtres, plates, crémeuses, à contours réguliers. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des bacilles à Gram négatif (fig.53).



Figure 53: Aspect des colonies de *Pasteurella* spp. (a) : colonies blanchâtres sur Cétrimide, (b) : bacille ; Gram négatif ($\times 100$).

Le résultat de l'identification biochimique de *Pasteurella* spp. par API 20 E est la suivante : (Fig.54).

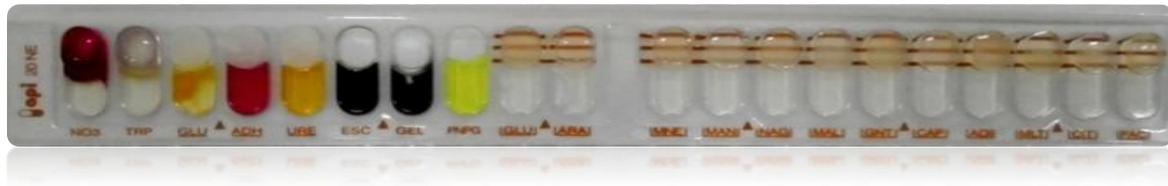


Figure 54: Profil biochimique de *Pasteurella* spp.

4.4. Les staphylocoques pathogènes :

A partir des prélèvements effectués nous avons isolé une souche de *Staphylococcus aureus* et une souche de *Micrococcus* spp. :

- *Staphylococcus aureus* à partir de la chair des carassins communs pêchés du point de prélèvement **S3** pendant le mois de Février.
- *Micrococcus* spp. à partir de la chair des carassins communs pêchés du point de prélèvement **S2** pendant le mois de Mars.

➤ Résultats des examens macroscopique et microscopique :

L'aspect macroscopique des colonies de *Staphylococcus aureus* qui ont été poussées sur la gélose Chapman est le suivant : Colonies moyennes jaunes, bombées, lisses, brillantes, à contours réguliers avec virage de la couleur du milieu vers le jaune. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des Cocci regroupés en amas à Gram positif (Fig.55).

L'aspect macroscopique des colonies de *Micrococcus* spp. qui ont été poussées sur la gélose Chapman est le suivant : Colonies moyennes blanchâtres, Colonies blanchâtres, virage de milieu. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des Cocci, Gram positif (Fig.56).

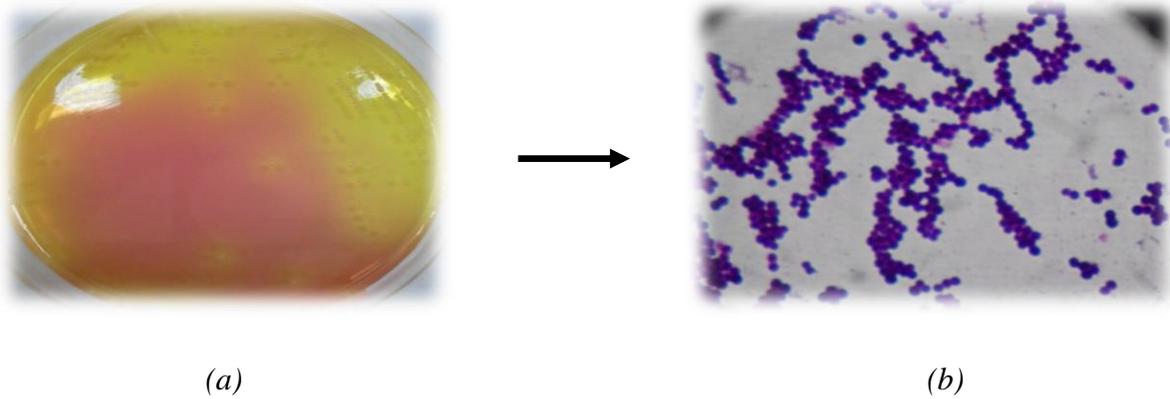


Figure 55: Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus*, (a) : colonies jaunes sur Chapman avec virage de couleur, (b): Cocci en amas à Gram positif ($\times 100$).

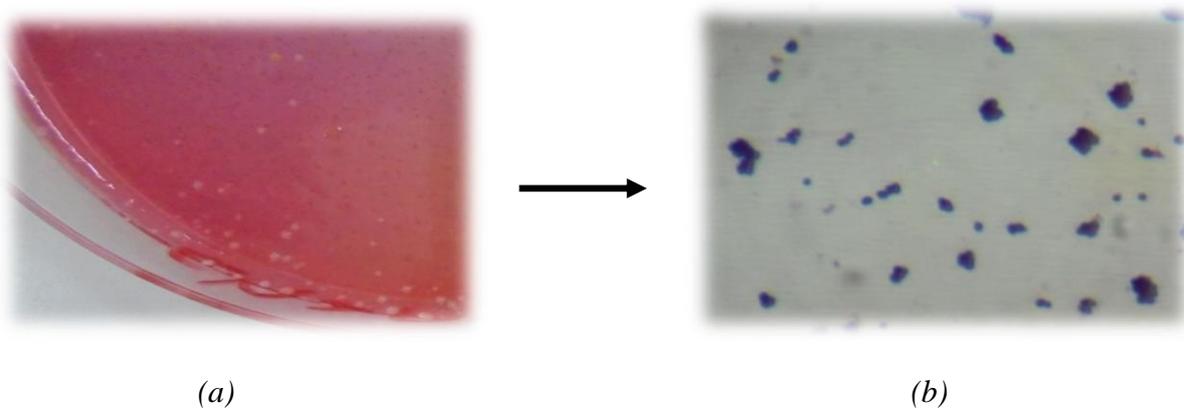


Figure 56: Aspect des colonies de *Micrococcus* spp. (a) : colonies blanchâtres sur Chapman (b): Cocci, Gram positif ($\times 100$).

➤ **Résultats de l'identification biochimique :**

Les résultats de l'identification des bactéries poussées sur Chapman sont représentés dans le tableau suivant :

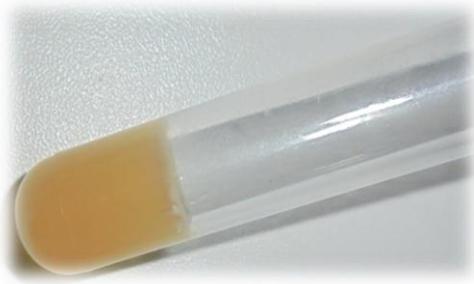
Tableau 15 : Résultat de l'identification des souches bactériennes poussées sur la gélose Chapman.

Souche \ Tests	Catalase	Coagulasse	Mannitol
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Micrococcus</i> spp.	+	-	-

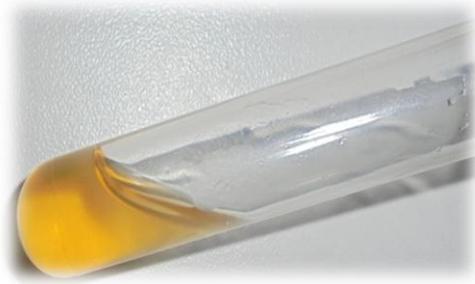
(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négatif

➤ **Test de coagulation :**



Coagulase positif



Témoin

Figure 57: Résultat du test Staphylocoagulase.

- L'identification des deux souches a été complétée par l'API Staph et les résultats obtenus sont:



Figure 58: Profil biochimique de *Staphylococcus aureus*.



Figure 59: Profil biochimique de *Micrococcus* spp.

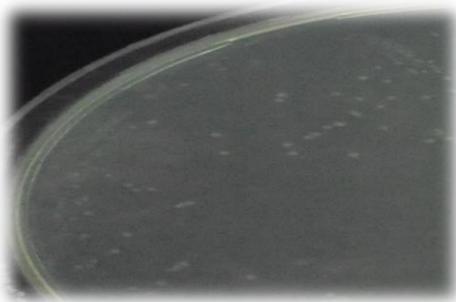
4.5. Streptocoques :

➤ **Résultats des examens macroscopique et microscopique :**

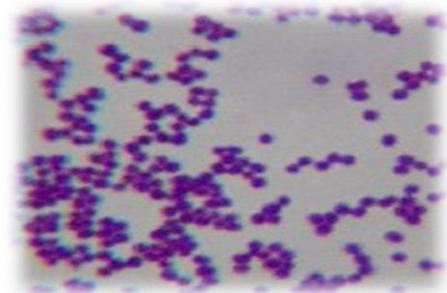
Après culture des streptocoques sur le milieu Eva-Litsky, l'aspect des colonies repiquées sur la gélose nutritive est le suivant :

Tableau 16 : Aspect macroscopique et microscopique des colonies poussées sur la gélose GN après culture sur Eva-Litsky.

Période de prélèvement	Points de prélèvement	Partie étudiée	Observation macroscopique	Observation microscopique
P 2 : 10/03/2015	S3	Branchie	Colonies blanchâtre petites, bombées, à contours réguliers, brillantes, crémeuses (Fig. 60).	Cocci à Gram positive (Fig.60).



(a)



(b)

Figure 60: Aspect des colonies poussées sur la gélose GN après culture sur Eva-Litsky.

(a) : colonies blanchâtres ;(b): Cocci à Gram positif ($\times 100$).

L'identification des colonies poussées sur la gélose GN après culture sur Eva-Litsky a été effectuée par l'API 20 Strep et le résultat obtenu est : une *Enterococcus faecium* (Fig. 61).



Figure 61: Profil biochimique d'*Enterococcus faecium*.

4.6. *Aeromonas*

Quatre souches d'*Aeromonas* ont été isolées durant notre période d'étude :

- *Aeromonas hydrophila* (A1) à partir du mucus du carassin commun pêché du point de prélèvement S1 pendant le mois de Mars.
- *Aeromonas hydrophila* (A2) à partir de la chair des carassins communs pêchés du point de prélèvement S2 pendant le mois de Mars.
- *Aeromonas hydrophila* (A3) à partir de branchie des carassins communs pêchés du point de prélèvement S3 pendant le mois de Mars.
- *Aeromonas hydrophila* (A4) à partir de la chair des carassins communs pêchés du point de prélèvement S3 pendant le mois de Février.

Les trois souches d'*Aeromonas hydrophila* (A1, A2, A3) ont été isolées sur la gélose Columbia au sang par contre la souche d'*Aeromonas hydrophila* (A4) a été isolée sur la gélose Hektoen.

➤ Résultats des examens macroscopique et microscopique :

L'aspect macroscopique des trois souches d'*Aeromonas hydrophila* (A1, A2, A3) qui ont été poussées sur la gélose Columbia au sang est le suivant : Colonies blanchâtres grandes et moyennes, brillantes, crémeuses, plates. Les examens microscopiques de ces colonies montrent que ce sont des bacilles à Gram négatif (Fig.62).

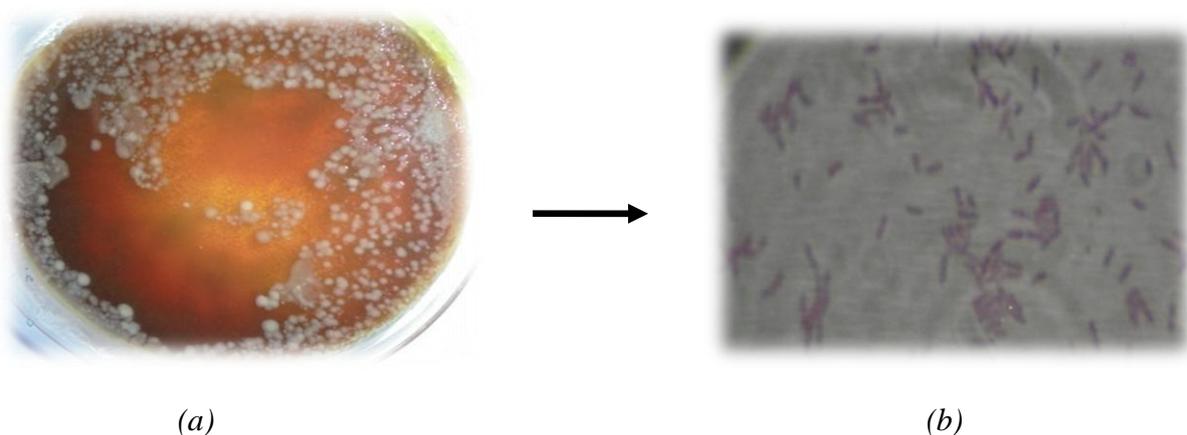


Figure 62: Aspect des colonies d'*Aeromonas hydrophila*; (a) : colonies blanchâtres sur Columbia Au sang ; (b) : bacille, Gram négatif. (×100).

➤ Résultats de l'identification biochimique :

Les résultats de l'identification des bactéries poussées sur la gélose Columbia au sang sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Résultat de l'identification des souches bactériennes poussées sur la gélose columbia au sang.

Tests Souches	TSI				Mannitol Mobile		Urée indole		Nitrate réductase	Oxydase	Catalase
	H ₂ S	Gaz	Glu	Lac	MAN	MOB	URE	IND			
<i>Aeromonas hydrophila</i> (A1, A2, A3) (fig.61).	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+

(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négatif



Figure 63: Résultat de certains tests biochimique classique pour *Aeromonas hydrophila* (A1).

- ❖ L'identification des trois souches a été complétée par L'API 20 NE et le résultat obtenu a confirmé que les trois souches A1, A2, et A3 sont : *Aeromonas hydrophila* (Fig. 64).



Figure 64: Profil biochimique d'*Aeromonas hydrophila* (A1).

- L'aspect macroscopique des colonies d'*Aeromonas hydrophila* (A4) qui ont été poussées sur la gélose Hektoen est le suivant : Colonies moyennes, vertes jaunâtres, plates, à contours réguliers. L'examen microscopique de ces colonies montre que ce sont des bacilles à Gram négatif (Fig.65).



Figure 65: Aspect des colonies d'*Aeromonas hydrophila* (A4); (a) : colonies vertes jaunâtres sur la gélose Hektoen, (b): bacille ; Gram négatif. (×100).

Le résultat de l'identification biochimique d'*Aeromonas hydrophila* (A4) par API 20 E est le suivant (Fig.66) :



Figure 66: Profil biochimique d'*Aeromonas hydrophila* (A4).

- ❖ Au total, l'identification de la flore bactérienne des poissons peuplant le canal Messida a révélé la présence de 31 espèces réparties comme suit:

Tableau 18 : Les bactéries identifiées à partir du *Carassius carassius* peuplant les eaux du canal Messida.

Points de prélèvement	Partie du corps	Les bactéries identifiées
S1	Branchie	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Pantoea</i> spp. ○ <i>Vibrio fluviatis</i> ○ <i>Pasteurella</i> spp. ○ <i>Raoultella terrigena</i> ○ <i>Enterobacter sakazakii</i> ○ <i>Pseudomonas luteola</i>
	Mucus	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Citrobacter braakii</i> ○ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A1)
	Chair	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Enterobacter cloacae</i> ○ <i>Salmonella choleraesuis</i> spp <i>arizonae</i> ○ <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i> ○ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
S2	Branchie	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Escherichia coli</i> 1 ○ <i>Salmonella</i> spp. (Sa2) ○ <i>Proteus merabilis</i>
	Mucus	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Escherichia vulneris</i> ○ <i>Hafnia alvei</i>
	Chair	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Salmonella</i> spp. (Sa1) ○ <i>Micrococcus</i> spp. ○ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A2) ○ <i>Salmonella</i> spp. (Sa3)
S3	Branchie	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Serratia ficaria</i> ○ <i>Vibrio alginolyticus</i> ○ <i>Enterococcus faecium</i> ○ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A3)
	Mucus	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Citrobacter freundii</i> ○ <i>Pantoea</i> spp. 2 ○ <i>Kluyvera</i> spp.
	Chair	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Staphylococcus aureus</i> ○ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A4) ○ <i>Serratia odorifera</i>1

5. Résultats de l'antibiogramme :

Les résultats de l'antibiogramme réalisé pour les espèces identifiées sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Résultats de l'antibiogramme.

Antibiotiques Espèces	P10	E15	L10	AMC 30	TE30	VA30	B 8	C30
<i>Micrococcus</i> spp. (fig.67)	S	S	S	S	/	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> (fig.68)	S	R	S	S	/	/	/	/
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	R	/	R	S	/	/	/
<i>Aeromonas hydrophila</i> (A1)	R	R	R	R	/	/	/	/
<i>Salmonella</i> spp. (Sa2) (fig.69)	R	R	R	S	/	R	/	/
<i>Serratia odorifera</i> 1 (fig.70)	R	R	R	R	/	R	/	/
<i>Vibrio alginolyticus</i>	R	/	R	R	S	R	/	/
<i>Enterococcus faecium</i> (fig.71)	S	R	R	R	S	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i> (fig.72)	R	R	R	R	/	R	/	/
<i>Pantoea</i> spp. 2 (fig.73)	R	R	R	R	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> (fig.74)	R	R	R	R	/	/	/	/
<i>Enterobacter sakazakii</i> (fig.75)	R	R	R	R	/	R	/	/
<i>Raoultella terrigena</i> (fig.76)	R	R	/	R	/	/	/	/
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	/	R	S	/	/	/
<i>Vibrio fluvialis</i>	S	/	/	/	S	/	S	S
<i>Escherichia coli</i> 1	R	/	/	/	S	/	R	S
<i>Salmonella</i> spp. (Sa1)	R	/	/	/	/	/	R	/
<i>Citrobacter braakii</i>	R	/	/	/	S	/	R	S
<i>Pantoea</i> spp.	R	/	/	/	S	/	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	R	/	/	/	S	/	S	S

S : sensible

R : résistant

I : intermédiaire

/ : non effectuée

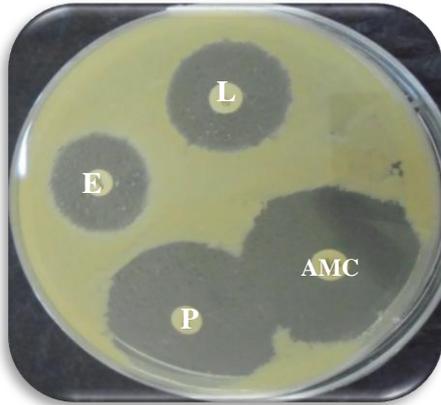


Figure 67: Résultat de l'antibiogramme de *Micrococcus* spp.

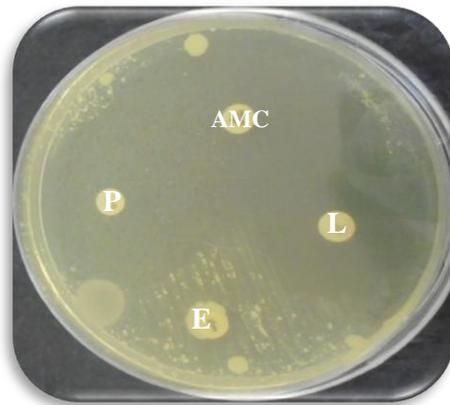


Figure 68: Résultat de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*

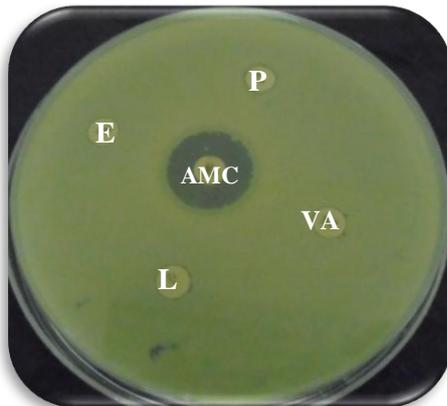


Figure 69: Résultat de l'antibiogramme de *Salmonella* spp. (Sa2)



Figure 70: Résultat de l'antibiogramme de *Serratia odorifera1*

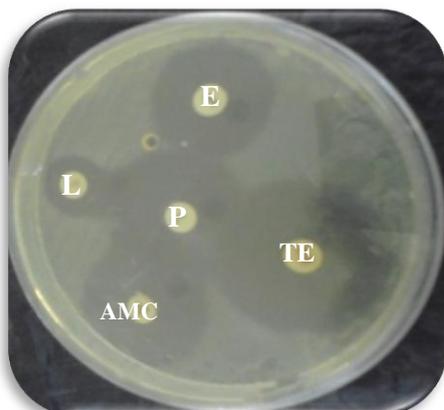


Figure 71: Résultat de l'antibiogramme d'*Enterococcus faecium*

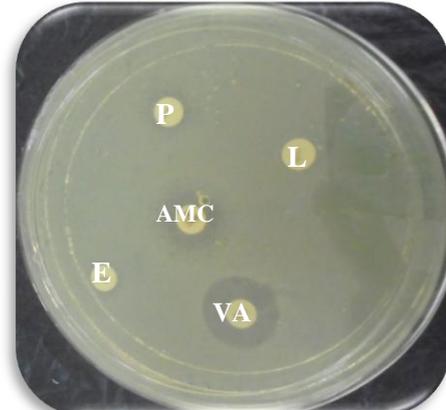


Figure 72: Résultat de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae* spp ozaenae

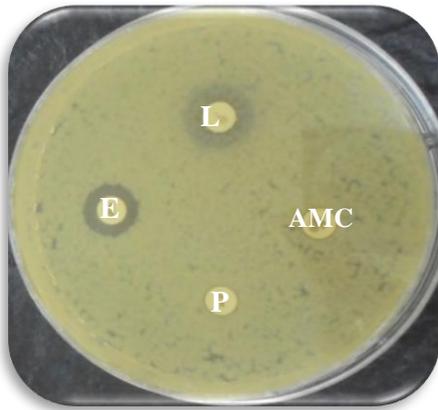


Figure 73: Résultat de l'antibiogramme de *Pantoea* spp.2

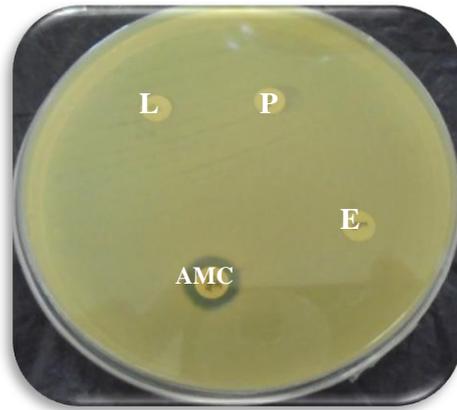


Figure 74: Résultat de l'antibiogramme de *Proteus mirabilis*



Figure 75: Résultat de l'antibiogramme d'*Enterobacter sakazakii*

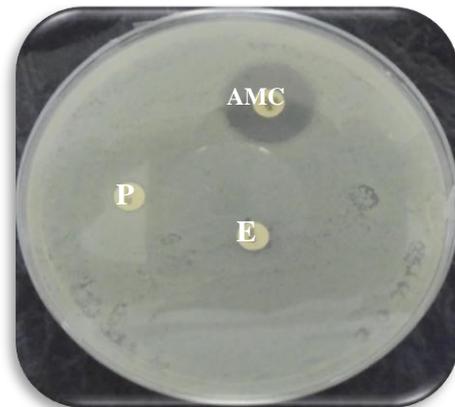


Figure 76: Résultat de l'antibiogramme de *Raoultella terrigena*

II. Discussion :

Altérations des carassins communs étudiés:

La prévalence globale (P%) de poissons atteints de lésions externes est égale à 18.66 %. Ces lésions sont présentes essentiellement au niveau de la peau sous la forme d'érosions, de nécroses ou d'hémorragies. Leur origine est probablement due à des parasites, des maladies bactériennes (*Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. et *Escherichia coli*), des polluants chimiques, des carences vitaminiques ou des traumatismes.

Les bactéries isolées des carassins communs étudiés :

Afin de connaître la composition bactérienne des différentes parties de corps du carassin commun *Carassius carassius* peuplant les eaux du canal Messida, nous avons isolé et identifier le maximum des souches bactériennes présentes dans les branchies, le mucus et la chair, 31 espèces bactériennes appartenant à différents groupes ont été identifiées: entérobactéries (19 espèces), vibrions (02 espèces), *Pseudomonas* (02 espèces), *Aeromonas* (04 espèces), *Pasteurella* (01 espèce), staphylocoque (01 espèce), microcoque (01 espèce), et entérocoque (01 espèce).

Plusieurs genres appartenant à la famille des *enterobacteriaceae* ont été détectés dans les trois parties étudiées (branchie, mucus et chair), ceci est expliqué par la présence ubiquitaire des entérobactéries dans la nature, on peut les retrouver notamment dans la flore digestive de l'homme et des animaux, chez les végétaux, et dans l'environnement (sol et eau) (Cristian et al., 2008).

Deux espèces de *Vibrio* ont été détectées : *Vibrio fluvialis* et *Vibrio alginolyticus* au niveau des branchies. Ces espèces sont considéré comme les espèces les plus fréquentes vivants librement dans l'eau et les sédiments et peuvent survivre dans l'eau de mer, même dans des conditions de stress tout en conservant leur virulence (Mustapha et al., 2013).

Ces espèces peuvent causées une vibriose des poissons, septicémie et lésions chroniques (ulcères buccaux, cutanés et foyers nécrotiques internes) [25].

Le genre *Pseudomonas* est très répandue dans la nature, mais nos analyses ont permet d'isoler seulement deux espèces : *Pseudomonas luteola* à partir des branchies et *Pseudomonas fluorescens* à partir de la chair.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires. Elles ont une capacité remarquable à s'adapter et survivre dans de nombreuses niches écologiques de caractéristiques différentes. On les retrouve dans les eaux, les sols, les végétaux et les denrées alimentaires. La chimio-organotrophie et leurs exigences nutritives modestes leur permettent de survivre et de se multiplier dans des environnements humides.

La présence de ces espèces peut causer des altérations pour le poisson étudié si leur charge est importante, elles sont responsables des pigmentations noires et au niveau de la nageoire pectorale, pelvienne et anale (Coignet., 2014).

Une *Pasteurella* spp. a été isolé à partir des branchies, la présence de ce genre bactérien peut être expliqué par le fait que c'est une bactérie commensale des muqueuses des animaux (mammifères, oiseaux, poissons et fruits de mer) domestiques et sauvages. Il existe des pasteurelloses qui touchent les poissons mais les agents responsables sont *Pasteurella piscicida* et *Pasteurella multocida* [32].

Quatre souches d'*Aeromonas hydrophila* ont été isolées à partir des trois parties de corps étudiés. Cette espèce est aussi une espèce ubiquiste plus fréquente aussi bien en eaux marines qu'en eaux douces. Cette bactérie a une répartition géographique mondiale dans les eaux douces, les eaux de faible salinité, et les sédiments. D'une manière générale l'environnement aquatique constituent l'habitat principal de ce germe (Euzéby, 2002).

La possibilité de toxi-infections alimentaires ou d'intoxications suite à la consommation des carassins communs peuplant les eaux du site d'étude n'est pas exclue, car les souches d'*Aeromonas hydrophila* produisent fréquemment des hémolysines et des entérotoxines ce qui suggère un rôle dans la survenue de toxi-infections alimentaires. Actuellement elle est reconnue comme une bactérie responsable de pathologies digestives et extra-digestives (Euzéby, 2002).

La présence des espèces du genre *Staphylococcus* et *Micrococcus* (*S.aureus*, et *Micrococcus* spp.) est due au caractère ubiquiste de ces genres bactériens, elles sont très répandue dans la nature (eau, sol, et air) comme on peut les trouvées sur la peau des humains et des animaux (Cristian et al., 2008). La détection de *S.aureus* au niveau de la chair peut constituer un risque sanitaire sérieux pour les consommateurs par la production d'un grand nombre de substances diffusibles (Hémolysines, Leucocidine et Entérotoxines) [26].

Les Microcoques sont généralement non pathogènes, ils peuvent se comporter en pathogènes opportunistes [27].

Le genre *Enterococcus* comprend une vingtaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux, la détection d'*Enterococcus Faecium* au niveau des branchies est expliquée par sa présence dans l'eau suite à la contamination de ce dernier par les matières fécales de l'homme et de l'animal (elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains) (Clausen *et al.*, 1977).

- ❖ La détection de plusieurs bactéries (commensales et pathogènes) au niveau des différentes parties de corps des carassins *Carassius carassius* est probablement liée à la présence de ces bactéries dans les eaux du canal Messida (leur milieu de vie) :
- La localisation des bactéries au niveau des branchies est expliquée par leur contact direct avec l'eau lors de la respiration (c'est l'organe principale capable d'assurer les apports en O₂ indispensable à la vie des poissons) et le déplacement (Bourgeois, 1988), donc elles retiennent toutes les particules ainsi que les bactéries présentes dans l'eau (Bruslé et Quignard, 2004).
- En ce qui concerne le mucus, sa contamination est due à la colonisation des bactéries de l'environnement de vie à la surface de la peau du poisson et largement au niveau des alvéoles des écailles (Huss, 1988).
- La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est stérile car le système immunitaire du poisson empêche les bactéries de se proliférer dans sa chair. A la mort du poisson, le système immunitaire s'effondre et les bactéries peuvent proliférer librement (Huss, 1988). Du fait que seul un nombre limité d'organismes envahit réellement la chair et que le développement microbien se situe essentiellement à la surface, l'altération s'avère probablement, pour une grande part, être une conséquence de la diffusion des enzymes bactériennes dans la chair et des nutriments à l'extérieur. (Huss, 1988).

Résistance aux antibiotiques :

Les résultats de l'antibiogramme montrent que toutes les souches isolées à partir des trois parties du corps des carassins sont résistantes à un ou plus d'antibiotique testé.

La majorité des entérobactéries isolées sont résistantes à la famille des Béta-lactamines : 100 % résistent à la pénicilline, et 85,71% résiste à l'amoxiciline. Cette résistance est

expliquée par la production des β -lactamases qui est retrouvée chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter* et *Proteus*) (Zogheib et Dupont, 2005).

Nos résultats ont montré aussi que 100 % des souches d'entérobactéries qui sont testées vis-à-vis de l'Erythromycine et Lincomycine sont résistantes à ces deux antibiotiques. Les germes Gram négatifs, en particulier les entérobactéries, sont intrinsèquement résistants aux macrolides, en effet, leur membrane cellulaire externe est imperméable aux composés hydrophobes tels que les macrolides [28].

La présence de quatre entérobactéries (tableau 19) résistantes à la Vancomycine, et au Bacitracine est expliquée par la résistance naturelle à ces antibiotiques qui est liée à une imperméabilité de leur paroi [29].

Parmi les vibrions isolés, seulement la souche de *Vibrio alginolyticus* est résistante à quatre antibiotiques : la pénicilline, l'amoxiciline, Lincomycine et la vancomycine. *Vibrio alginolyticus* présente une variété importante de résistance naturelle aux β -lactamines par production de plusieurs types de β -lactamases.

La résistance aux macrolides est principalement due à deux mécanismes: une modification de la cible par méthylation, inhibant la liaison entre l'antibiotique et sa cible ribosomiale, et un efflux actif de l'antibiotique, par contre la résistance à la Vancomycine est expliquée par la présence de gènes de résistance (Van A à G) [30].

Les deux souches de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* et *P.luteola*) sont résistantes à l'ampicilline et l'Amoxicilline. Cette bactérie est connue par la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression de plusieurs systèmes d'efflux, dont l'activité a été rapportée pour la première fois en 1994, ce qui lui permet de résister à divers antibiotiques (Livermore et Nikaido, 1994).

Aeromonas hydrophila (A 1) isolée du mucus des poissons étudiés a été résistante aux β -lactamines et aux macrolides. Ces résultats sont expliqués par une résistance enzymatique (β -lactamase) (Zogheib et al., 2005) et une résistance par imperméabilité. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Vivekanandhan et al. (2001) au sud de l'Inde qui a trouvé que la plupart des souches d'*Aeromonas hydrophila* étaient résistantes à l'Erythromycine.

Les profils de résistance de *Staphylococcus aureus*, et *Micrococcus* spp. est le suivant : P^S, E^R, L^S, AMC^S, et P^S, E^S, L^S, AMC^S. L'habitat de ces bactéries en milieu humide - eau, égouts - et sols riches en antibiotiques, lui confère des facteurs de résistance à plusieurs antibiotiques (Zogheib et Dupont, 2005), mais les souches isolées dans notre étude sont sensibles à la majorité des antibiotiques testés ce qui est expliquée par le fait que ce sont des phénotypes sauvages [31].

La dissémination de plusieurs bactéries résistantes aux antibiotiques dans les carassins communs peuplant le canal Messida peut être liée d'une part à une résistance intrinsèque, et d'autre part à une résistance acquise qui est due à un réacteur biologique dans lequel les échanges génétiques et les événements de recombinaison, influencés par les conditions biotiques et abiotiques, profilent l'évolution de l'antibiorésistance (Baquero *et al.*, 2008) :

- Le premier réacteur est constitué par les microflore humaines et animales, composées d'environ 500 espèces bactériennes qui par exemple, soumises à la pression exercée lors de traitements antibiotiques, augmentent l'émergence et la proportion de souches bactériennes résistantes et multirésistantes. Cette contamination étant principalement d'origine fécale (Sommer *et al.*, 2009). Plusieurs études ont montré que les bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier à la famille des bêta-lactamines, ont été à de nombreuses reprises rapportées chez les animaux d'élevage (Liebana *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2006), les animaux de compagnie (Wieler *et al.*, 2011 ; Dahmen *et al.*, 2013) et les animaux sauvages (Guenther *et al.*, 2011). Une autre étude a montré qu'aux abords d'un étang en République tchèque, des souches bactériennes antibio-résistantes ont été isolées des excréments d'oiseaux marins (Simões *et al.*, 2010 ; Dolejská *et al.*, 2009), ce qui montre que ces souches sont implantées dans ces écosystèmes.
- Le second réacteur comprend tous les lieux où les facteurs, tels que les antibiotiques, qui augmentent la proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci en fait des lieux d'émergence, d'échange et de dissémination des gènes de résistance dans les populations (Wright, 2010). L'échange naturel de gènes entre bactéries dans l'environnement est un fait connu (Bertolla *et al.*, 2000). Les trois mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT) identifiés (la conjugaison, la transduction et la transformation) ont été largement étudiés (Yin et Stotzky, 1997; Demanèche *et al.*, 2000). Par conséquent, la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans la colonne d'eau et dans les sédiments peut

affecter la qualité de l'eau mais aussi contribuer au HGT entre les bactéries, ce qui implique la diffusion généralisée de gènes résistants aux antibiotiques (Kümmerer, 2004; Demanèche et al., 2008; Thevenon et al., 2012).

- Le troisième réacteur correspond aux eaux usées, les effluents d'élevage et les résidus biologiques provenant des réacteurs précédents, où le mélange entre bactéries commensales et environnementales d'une part, et bactéries résistantes et sensibles d'autre part augmentent la probabilité des échanges entre bactéries, et par conséquent la dissémination de l'antibiorésistance (Wright, 2010). (Machado et al., 2009) ont montré que des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamase à large spectre étaient présentes dans des échantillons d'eau prélevés dans la rivière Sousa et au niveau de la côte de Porto, au Portugal, à proximité de points de déversement d'eaux usées (Machado et al., 2009). En Irlande, des bactéries antibio-résistantes ont été retrouvées dans des effluents traités se déversant dans la mer (Galvin et al., 2010) et dans une étude espagnole, les eaux de rivières prélevées en aval d'un point de versement d'effluents de stations d'épuration contenaient plus d'entérobactéries et de souches d'*Aeromonas* spp. résistantes aux antibiotiques que les eaux situées en amont de ce point de versement (Goñi-Urriza et al., 2000).

Finalement, nous pouvons dire que les carassins communs peuplant les eaux du canal Messida hébergent une flore bactérienne très diversifiées avec présence des espèces pathogènes résistantes à certains antibiotiques, en se référant aux normes de salubrité des poissons (tableau 07 –Annexe II), la consommation de ces poissons peut causer des problèmes sanitaires aux consommateurs s'ils ne sont pas suffisamment cuits.

Références bibliographiques

- **Alexandre A.F. (2005).** Parasites et parasitoses des poissons d'ornement d'eau douce Aide au diagnostic et propositions de traitement. Thèse de doctorat. LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT. P : 28.
- **Azeroual A., J. Crivellia, A. Yahyaoui et M. Dakk. (2000).** L'ichtyofaune des eaux continentales du Maroc. *Cybium*. P: 17-22.
- **Bacha M. et R. Amara. (2007).** Les poissons des eaux continentales d'Algérie. Étude de l'ichtyofaune de la Soummam. P : 356.
- **Baquero F., J. Martínez et R. Cantón. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol* , **19**. P : 260–265.
- **Barbier P. (2013).** Diversité génomique des espèces bactériennes du genre *Flavobacterium*. Thèse de Doctorat. UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE. P : 24.
- **Bazine N. et A. Bournane. (2011).** Evaluation de la qualité bactériologique des eaux d'Oued Messida. Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 de Guelma. P : 15- 20.
- **Beaulieu M. (1990).** principales maladies des poissons au québec. 2^e trimestre. Bibliothèque nationale du Québec. P : 31-38.
- **Benhalima L., Z. Bouslama et M. Bensouilah. (2013).** Suivi de la qualité physico-chimique et bactériologique d'un écosystème lotique (oued Messida -nord-est algérien) : pollution, et aptitude à la biologie. The 4th International Congress Water, Waste & Environment (EDE4) Agadir, Morocco. P : 5.
- **Bertolla F., R. Pepin, E. Passelegue-robe, A. Simkon, X. Nesme et P. Simonet. (2000).** Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solonchociformis*. *Appl. Env. Microbiol.* **66**. P: 4161 – 4167.
- **Bouchard B. (2008).** Étude écotoxicologique de l'impact des rejets urbains sur un mollusque d'eau douce du Québec (*Elliptio complanta*) : Effets sur le système immunitaire et endocrinien. Thèse de doctorat. ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON. P : 17.
- **Blanco J.L., T.Hrbek et I. DOADRIO. (2006).** A new species of the genus *Aphanius* (Nardo, 1832) (*Actinopterygii, Cyprinodontidae*) from Algeria. *Zootaxa*. P: 39-53.
- **Borges A., C.A. Conte-Junior, R.M. Franco, E.T. Mársico et M.Q. Freitas. (2014).** Quality Index Method (QIM) for the hybrid tambacu (*Colossomacropomum* × *Piaractusmesopotamicus*) and the correlation among its quality parameters. *LWT - Food Science and Technology*. P: 432- 439.

- **Bouchaala L. (2010).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued-Zénati(Guelma).Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945 de Guelma. P : 37-45.
- **Bouhaous M. et Z. Bengharez. (2012).** Contamination des eaux souterraines par les nitrates. Analyse microbiologie, source de contamination et évaluation sanitaire. Edition universitaire européennes. P : 5-14.
- **Bourgeois C.M., J.F.MESCLE. et J. ZUCCA. (1988).** Aspect microbiologique de la sécurité alimentaire. : Sciences tech. Agro alimentaire Paris tech. Doc. Lavoisier. P: 419.
- **BRUSLÉ J. et J.P. QUIGNARD. (2004).**Les poissons et leur environnement : Ecophysiologie et comportement adaptifs. Paris: Eds Tec & Doc. P : 6-833.
- **BRUSLÉ J. et J. P. QUIGNARD. (2013).** Biologie des poissons d'eau douce européens. 2e édition, Lavoisier, Paris. P : 216-220.
- **CASFM, 2013 :** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. (2013). document téléchargé depuis le site internet de la Société Française de Microbiologie : <http://www.sfm-microbiologie.org>.
- **Chaïbi R. (2014).** Connaissance de l'ichtyofaune des eaux continentales des la région des Aures et du Sahara septentrional avec sa mise en valeur .thèse de doctorat. Université Mouhamed Khayder de Beskra. P : 5-7.
- **Chalabi A. (2000).** Aquaculture en Algérie et son contexte maghrébin. Rapport de synthèse. Ministère de la Pêche et de l'Agriculture. P : 50.
- **Chernine S. (2010).**Identification des bactéries du genre *Aeromonas* et significations pathologiques des souches d'*Aeromonas* isolées e cliniques. . Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar d'Annaba. P : 27-28.
- **Clausen E., B. Green and W. Litsky. (1977).** Fecal streptococci: indicators of pollution. Indicators/Health hazards associated with water. *American Society for Testing and Materials*, ASTM STP 635. P: 247-264.
- **Coignet S. (2014).** Etude rétrospective des infections à *Pseudomonas luteola* chez le furet. Thèse pour le Doctorat. La Faculté de médecine de Créteil. ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT. p : 18-39.
- **CORVAGLIA A.R. (2006).** Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*,

Acinetobacter et *Legionella*. Thèse de doctorat. Faculté des sciences de l'Université de Genève.
P : 23.

- **Cristian C., B. Jacky, S. Eddy, M. Salavert et T. Armand. (2008).** Microbiologie Hygiène Bases Microbiologiques de la diététique. Édition TEC, DOC, Lavoisier, Paris. P : 76-79.
- **Dahmen S., M. Haenni et P. Châtre. (2013).** Characterization of blaCTXM IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother*; **68**: P : 797-801.
- **Degrement. (2005).** Memento technique de l'eau. Dixième Édition. Tec et Doc. P : 144-173.
- **Dellarras C. (2000).** Microbiologie de l'environnement avec législation : travaux pratique. Gaëtan moriu éditeur. P : 117-136.
- **Dellarras C. (2003).** Microbiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. gaetan morin éditeur. P : 223-230.
- **Demanèche S., L. Jocteur-Monrozier, H. Quiquampoix et P. Simonet. (2000).** Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA. *Appl. Env. Microbiol.***67**. P: 293-299.
- **Demanèche S., H. Sanguin, J. Poté, E. Navarro, D. Bernillon, P. Mavingui, M. Vogel et P. Simonet. (2008).** Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**. P: 3957-3962.
- **Direction des polluants et de l'assainissement des Territoires du Nord-Ouest (T.N.-O.)du canada (2004).**FEUILLETS D'INFORMATION SUR LES CONTAMINANTS DANS LES TERRITOIRES DU NORD-OUEST Les métaux lourds. Canada.
- **Dolejská M., B. Bierosová et L. Kohoutová. (2009).** Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black headed gulls. *J Appl Microbiol* ; **106**. P: 941-950.
- **Euzéby J.P. (2002).** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. L'Ordre des médecins vétérinaires du Québec. P : 4.
- **Euzéby J.P. (2008).** Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Lavoisier. P : 332.
- **Food and Agricultural Organisation (FAO). (2008).** Fish Stat Plus – Logiciel universel pour les séries chronologiques de données statistiques sur les pêches. Rome.
- **Food and Agricultural Organisation (FAO) / Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (2011).** PROGRAMME MIXTE SUR LES NORMES ALIMENTAIRES COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS. P : 5.

- **Fischer Z., V. P. Lyakhnovich. (1973).** Biology and bioenergetics of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Polskie Archiw Hydrobiol*, **20**. P: 521-557.
- **Galvin S., F. Boyle et P. Hickey. (2010).** Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl Environ Microbiol* ; **76**. P : 477-479.
- **Girard P. (1998).** Le poisson sentinelle des milieux aquatiques : pertinence et optimisation des indicateurs sanitaires. *Bull Fr Pêche Pisci*. P : 300–351 : 429–443.
- **Girard P., E. Pierre. (2007).** Manuel d'identification des principales lésions anatomomorphologiques et des principaux parasites externes des anguilles. Cemagref /ASSOCIATION « Santé Poissons sauvage ».Etude Cemagraf n°110. P: 3-26.
- **Goñi-Urriza M., M. Capdepuy et C. Arpin. (2000).** Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* ; **66**. P : 125-132.
- **Guenther S., C. Ewers et L. Wieler. (2011).** Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution. *Front Microbiol*; **2**. P: 246-260.
- **Guiraud J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Édition RIA Dunod. P : 359-722.
- **Huss H. (1988).** Le poisson frais : qualité et altérations de la qualité,manuel de formation préparé pour le programme de perfectionnement FAO/DANIDA sur la technologie du poisson et le contrôle de qualité.Rome :FAO.Printbook. P : 43.
- **International Union for Conservation of Nature (IUCN), (2006)** - Red list of threatened species. www.iucnredlist.org.
- **Jacquet S., I. Domaizon¹, S. Masquelier, C. Lepère, L. Guillou, A. Chambouvet, D. Debros et T. Sime-Ngando. (2011).** virus, bactéries et protistes pathogènes du phytoplanctonle rôle insoupçonné des parasites dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA*.**3.60**. Paris. P : 39.
- **Jérôme B., G. Guillaume, C. Le Pichon et E. Tales. (2009).** Le peuplement de poissons du bassin de la Seine. Cemagref, Hydrosystèmes et bioprocédés. P : 16.
- **Joffin J. et G. Leyrol. (2003).** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3^{ième} éditions ; CRDP d'Aquitaine. P: 320-331.
- **Jouve J.L. (1996).** La qualité microbiologique des aliments. Maîtrise et critères. CNERNA-CNRS. Polytechnica éditions. P : 29.

- **Junning C., L. Ping Sun et H. Nathanael. (2011).** Évaluation de l'avantage comparatif pour l'aquaculture Cadre d'évaluation et application à certaines espèces 528 dans les pays en voie de développement. Rome. P : 37.
- **Kadari G. (1984).** Les techniques de peche utilisées en Algérie.9, boulevard khemisti. Alger. P : 91-92.
- **Kara M. H. (2012).** sresh water fish divesity in algeria with emphasis on alien species. *Eur J Wildl Res.* **58**. P : 43 – 253.
- **Kümmerer K. (2004).** Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemoth.* **54**, P : 311-320.
- **Larpent J. (1997).** Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de labo. Edition Tec et Doc. P : 294-300.
- **Liebana E., M. Batchelor et K. Hopkins. (2006).** Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* ; **44**. P:16-24.
- **Light foot Nigel Francis. (2002).** Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directives pour l'assurance qualité. P : 387-398.
- **Livermore D. et H. Nikaido. (1994).** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* : Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* P: 38-41.
- **Lounaci D. (2012).** Les poissons d'eau douce d'Algérie : inventaire et répartition. 3ème Congrès Franco-Maghrebain de Zoologie et d'Ichthyologie -. Marrakech – Maroc.
- **Machado E., T. Coque et R. Cantón. (2009).** Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*; **63**. P : 616-618.
- **Mbega J. (2013).** Systématique des poissons africains. ECOLE d'été. P : 05.
- **Mesa R., V. Blanc et A. Blanch. (2006).** Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*; **58**. P: 21–25.
- **Mustapha S., M.M. Ennaji et N. Cohen.(2013).** *Vibrio Alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *International Journal of Science and Technology (IJST)*. **2**. P:303.
- **Ovidio M., J.C. Philippart. (2008).** Les phénomènes de mobilité chez les poissons de nos cours d'eau. *Le Pêcheur Belge*. **1**. P :20-23.

- **Ozaktas T., B. Taskin et A.G. Gozen. (2012).** High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture freshwater environment. *Water Research*. **46**. P: 6382 – 6390.
- **Pierre S., N. Castignolles, F. Petit, I. George, C. Buffetk-Janvresse et A. Ficht. (1999).** contaminations bactérienne et virale. ifremer.France. P : 4.
- **Papadol M, (1969).** Recherche sur la biologie de la reproduction du carassin (*Carassius carassius*) dans le bassin inférieur du Danube. *Acta soc zool Bohemoslov* .**3**. P : 40-55.
- **Paszkowski C. A. (1996).** Predation risk and feeding patterns of crucian carp. *J Fish Biol*. **48**. P: 818-828.
- **Pellegrin J. (1921).** Les poissons des eaux douces de l’Afrique du Nord française (Maroc, Algérie, Tunisie, Sahara). *Mêm. Soc. Sci. Nat. Maroc*. **1**. P: 1-217.
- **Perdices A. et I. Doadrio. (1992).** Presence of the Asiatic cyprinid *Peudorasbora parva* (Schlegel 1842) in North Africa .*Misc. Zool.*, **16**. P : 236-239.
- **Playfair H.M. et M. Letourneux. (1871).** Memoir on the hydrogeographical system and the freshwater fish of Algeria. *Ann mag Nat Hist* 8(4). P :373– 394.
- **Poillabauer C. et R. Alliod. (2010).** Atelier sur les indicateurs environnementaux en eau douce. ERBIO, Etude et recherche biologiques. Nouvelle-calédonie. P : 3.
- **Rodier J. (1996).** L’analyse de l’eau ; Eaux Naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 8^{ième} édition. Dunod. P : 135- 160.
- **Rodier J. (2005).** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles. Résiduaire. Eau de mer. 8^{ème} édition. Dunod. P : 135- 160.
- **Rodier J., B Legure et N Merlet. (2009).** L’analyse de l’eau ; Eaux Naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 9^{ème} édition. Dunod. Paris. P : 138-145.
- **Seurat L. G. (1922)** - Faunes des eaux continentales de la Berbérie.*Bull.Soc.niai.Nul.de l’Afrique du Nord*.T.i3. Severn Valley Field Club », Shrewsbury. P: 1-36.
- **Silan P., M. LANGLAIS et G. LATU. (1999).**Dynamique des populations de monogènes, ectoparasites de téléostéens : stratégies démographiques et implications mathématiques. *Ecologie*, t. 30 (4). P : 32.
- **Simões R., L. Poirel et P. Costa. (2010).** Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* ; **16**. P: 110-112.
- **Sommer M., O. Dantas et G. Church. (2009).** Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora.*Science*, **325**. P : 1128–1131.

- **Sylvie C. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Le parrainage des antimicrobiens : vision2010*. **42**. P : 7.
- **Thevenon F., N. Regier, C. Benagli, M. Tonolla, T. Adatte et J. Poté. (2012).** Characterization of faecal indicator bacteria in sediments cores from the largest fresh water lake of Western Europe (Lake Geneva, Switzerland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **78**. P : 50-56
- **Tronczynski J., C. Munscy et K. Moisan. (1999).** Les contaminants organiques qui laissent des traces : sources, transport et devenir. ifremer. France. P : 4.
- **Ulhand F.C., D. Martineau, I. Mikaelian et S. Laurent. (2000).** Maladies des poissons d'eau douce du Québec : guide de diagnostic. 2^e trimestre. Les presses de l'Université de Montréal. Printbook. P : 371-372.
- **Uhland F. C. (2004).** Maladies communes dans les piscicultures du Québec et interventions vétérinaires. *médecin vétérinaire du Québec*, **34**. P : 268-274.
- **Villers j., M. Squilbin et C. Yourassowsky. (2005).** Qualité physico-chimique et chimique des eaux de surface: cadre général. P : 17.
- **Wieler L., C. Ewers et S. Guenther. (2011).** Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int J Med Microbiol*; **301**. P: 635-641.
- **Wright G. (2010).** Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**. P : 589–594.
- **Yin X et G. Stotzky. (1997).** Gene transfer among bacteria in natural environments. *Adv. Appl Microbiol.* **45**. P:153-212.
- **Zeraoula A. (2011).** Microbiologie de l'eau d'une zone humide littorale exotique cas d'Oued Messida. Mémoire de Magister en Biologie-Ecologie. Université 8 Mai 1945 de Guelma. P : 20-25.
- **Zogheib E. et H. Dupont. (2005).** Entérobactéries multirésistantes. Unité de réanimation polyvalente, département d'anesthésie-réanimation, CHU Nord, place Victor Pauchet, 80054 Amiens cedex, France. P : 153-165.
- **Zouakh D.E. et R. Bouhadad. (2002).** Potentialités aquacoles des eaux continentales algériennes. Commémoration de la Journée mondiale de l'alimentation, Alger, MATE. P : 32-45.

Les sites web :

[1] http://www.hc-sc.gc.ca/fniah-spnia/pubs/promotion/_safety-salubrite/fish-poisson-fra.php .
Consulter le : (12/05/2015).

[2] www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2003_147_1_04.pdf. Consulter le: (12/03/2015).

[3] <http://www.aquaportail.com/fiche-poisson-3063-carassius-carassius.html>. Consulter le :
(08/03/2015).

[4]<http://www.aquaportail.com/definition-6139-eau-de-surface.html>. Consulter le :
(15/03/2015).

[5] www.parc-marin-irpose.fr . Consulter le : (10/05/2015).

[6] <http://www.assistancescolaire.com/eleve/5e/svt/reviser-une-notion/la-repartition-des-etres-vivants-le-long-d-un-cours-d-eau-5srm02>. Consulter le : (02/02/2015).

[7] <http://www.cpepesc.org/Les-principaux-parametres.html> . Consulter le (12/05/2015).

[8]<http://www.achigan.net/article/-118-les+maladies+des+poissons.html>. Consulter le :
(27/02/2015).

[9]<http://aquabulle.forumperso.com/t102-les-facteurs-abiotiques-et-biotiques-defavorables-pour-nos-poissons> . Consulter le : (05/05/2015).

[10] www.parc-marin-irpose.frconsulté . Consulter le (06/05/2015).

[11]<http://www.assistancescolaire.com/eleve/5e/svt/reviser-une-notion/la-repartition-des-etres-vivants-le-long-d-un-cours-d-eau-5srm02>. Consulter le (02/02/2015).

[12] <http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/8740-gangrene-definition>. Consulter le :
(19/04/2015).

[13] <http://www.agr.gouv.qc.ca/pac/publication> . Consulter le : (20/04/2015).

[14]<http://www.aquabase.org/disease/view.php3?id=25&desc=furonculose>. Consulter le :
(20/04/2015).

[15] <http://www.bf.refer.org/peche/chap6/chap65.html> . Consulter le : (08/03/2015).

- [16] <http://aquasystematique.com/2013/07/04/maladies-des-poissons-d-aquarium/html>. Consulter le : (08/03/2015).
- [17] www.arnobio2.com/pratique-bacteriologie-galerie-api.html . Consulter le: (17/04/2015).
- [18] www.techmicrobio.eu/.../API20%20Staph/API20%20Staph.pdf. Consulter le : (29/02/2015).
- [19] www.scribd.com/doc/10644/API20Strep . Consulter le : (25/02/2015).
- [20] http://www.itameriportaali.fi/en/galleria/galleriakuvat/en_GB/algae/. Consulter le : (22/02/2015).
- [21] http://www.cabri.org/CABRI/s-doc/cip_bact.info.html . Consulter le : (29/02/2015).
- [22] <http://www.dsmz.de/index.htm> . Consulter le : (25/03/2015).
- [23] <http://www.aquaportail.com/fiche-poisson-3063-carassius-carassius.html>. Consulter le : (08/03/2015).
- [24] http://claude.annaix.free.fr/Bacterio/PPM_FR1. Consulter le (11/02/2015).
- [25] <http://www-sv.cict.fr/bacterio/introduction.html>. Consulter le : (17/02/2015).
- [26] <http://anne.decoaster.free.fr/staph/staph.htm>. Consulter le : (10/02/2015).
- [27] <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/TP/FamilleMicrococcaceae-Micrococcus.pdf> . Consulter le : (14/02/2015).
- [28] www.pharmaetudes.com/les_sources/.../25macrolides-et-apparentes.pdf. Consulter le : (19/02/2015).
- [29] www.pharmaetudes.com/ressources/.../section5/28-glycopeptides.pdf. Consulter le (23/02/2015).
- [30] https://www.iph.fgov.be/ClinBio1/bckb33/activities/external_quality/rapports/_fr/rapports_annee.htm. Consulter le : (15/02/2015).
- [31] <http://www.collegebvh.org/fmc/vibrio.php3>. Consulter le : (21/02/2015).
- [32] <http://coproweb.free.fr/pagbac/indexbac/pmultoci.htm> . Consulter le : (19/02/2015).
- [33] <http://www.sfm-microbiologie.org/>. Consulter le : (27/02/2015).

Annexe I:

❖ Les milieux de culture utilisés :

▪ Gélose de Mac Conkey :

Composition:

- Peptone pancréatique de gélatine	17,0 g
- Tryptone.....	1,5 g
- Peptone pepsique de viande	1,5 g
- Lactose	10,0 g
- Sels biliaires.....	1,5 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Rouge neutre	30,0 mg
- Cristal violet	1,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	13,5 g
- Eau distillé.....	1000 ml

pH : 7,3 ± 0,2.

▪ Gélose Hektoen :

Composition:

-Protease peptone.....	2 g
- Extrait de levure.....	3 g
- Chlorure de sodium.....	5 g
-Thiosulfate de sodium.....	5 g
- Sels biliaires	9 g
-Citrate de fer ammoniacale.....	1.5 g
- Salicine	2 g
- Saccharose.....	12 g
- Lactose	2 g
- Fuchsine acide.....	0.1 g
- Bleu de brothynol.....	0.06 g
-Agar.....	1.4 g
-Eau distillée.....	1000 ml

pH =7.5

▪ **Gélose SS :**

Composition :

- Peptone pancréatique de viande	5,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Lactose	10,0 g
- Sels biliaires.....	8,5 g
- Citrate de sodium.....	10,0 g
- Thiosulfate de sodium.....	8,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....	1,0 g
- Rouge neutre	25,0 mg
- Vert brillant.....	0,33 mg
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g
- Eau distillé.....	1000 ml

pH = 7,0

▪ **Milieu TSI:**

Composition :

-Extrait de l'oeuf	3g/L
-Agar.....	12g/L
-Extrait de levure	3g/L
- Peptone	20g/L
- Lactose.....	10g/L
- Saccharose.....	10g/L
- NaCl.....	5g/L
- Glucose.....	1g/L
- Citrate ferrique.....	3g/L
- Thiosulfate de sodium.....	3g/L
- Rouge de phénol.....	0,025g/L
-Eau distillée.....	1000 ml

Ajouter pH à 7.4

▪ **Milieu citrate de Simmons:**

Composition :

-Chlorure de sodium.....	5g
-Sulfate de magnésium	0,2g
-Phosphate d'ammonium POH.....	1g
- Phosphate di potassique POHK.....	2g
-Citrate trisodique.....	2g
-Solution de bleu bromothymol 1%.....	8 ml
-Agar.....	15g
-Eau distillée.....	1000 ml

Ajuster le pH à 7-7.2.

▪ **Milieu mannitol- mobilité:**

Composition :

-Peptone pancréatique de viande.....	20g/L
- Agar-agar.....	4g/L
- Mannitol.....	2g/L
-Nitrate de potassium.....	1g/L
-Rouge de phénol solution à 1%.....	4ml
-Eau distillée.....	1000 ml

Ajuster le pH à 7.2.

▪ **Milieu Clark et lubs :**

Composition :

-Peptone tryptique de casein.....	5 g/L
- Phosphate bi potassique.....	5 g/L
- Glucose.....	5 g/L
- Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,5 (environ)

▪ **Milieu Urée-indole:**

Composition :

-L-tryptophane.....	3g
-Phosphate monopotassique.....	1g
-Phosphate di potassique.....	1 g
-Chlorure de sodium.....	5 g
-Urée.....	20 g
- Solution rouge de phénol à 1%.....	2,5 ml
-Alcool à 95°.....	10 ml
-Eau distillée.....	1000 ml

pH =6,7

▪ **Milieu Chapman:**

Composition:

-Peptone tryptique de caséine	10 g
-Extrait de viande.....	1 g
-Chlorure de sodium.....	75 g
-Mannitol.....	10 g
-Rouge de phénol.....	0.025 g
-Agar	15 g
-Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7.5

▪ **Gélose nutritive :**

Composition:

- extrait de viande de l'oeuf	1g
- Agar	15g
- peptone	5g
- chlorure de sodium.....	15g
- extrait de levure	2g

pH = 7.4

▪ **Gélose Cétrimide**

Composition :

- Peptones.....20 g
- Sulfate de potassium.....10 g

- Chlorure de magnésium.....3 g
- Phosphate dipotassique.....0,3 g
- Cétrimide.....0,2 g
- Acide nalidixique.....0,015 ml
- Glycérol.....10ml
- Agar.....13 g

pH =7,1

▪ **Milieu King A :**

Composition:

- Bacto-peptone.....20 g
- Agar.....15g
- Glycérol C.P.....10 g
- K₂ HSO₄ anhydre.....15 g
- MgCl₂ anhydre.....1.4 g
- Eau distillé.....1000 ml

pH = 7,2

▪ **Milieu King B:**

Composition:

- Protéose peptone (Difco).....20 g
- Agar.....15 g
- Glycérol C.P.....10 g
- K₂ HSO₄ anhydre.....15 g
- MgCl₂ anhydre.....1.4 g
- Eau distillé.....1000 ml

pH : 7,2 ± 0,2

▪ **Gélose Columbia au sang :**

Composition :

Mélange spécial de peptones.....	23g
Amidon.....	1g
NaCl.....	5g
Agar.....	10 g
Sang de mouton.....	50 ml

pH =7,3

▪ **Gélose Mueller-Hinton :**

Composition:

- Hydrolysât acide de caséine	17,5 g
- Infusion de viande.....	2,0 g
- Amidon soluble	1,5 g
- Agar agar bactériologique.....	17,0 g
-Eau distillé.....	1000 ml

pH= 6,7

❖ **Réactifs :**

▪ **Réactif TDA :** pour la recherche de tryptophane désaminase :

Perchlorure de fer.....	3.4 g
Eau distillée.....	100 ml

▪ **Réactif IND :** pour la recherche de l'indole :

Paradiméthyl aminobenzaldéhyde.....	5.0 g
Alcool isoamylique.....	75 ml
HCL	37%

▪ **Réactif de VogesProskauer (VP) :** pour la recherche de l'acétoïne :

▪ **VP 1 :**

Hydroxyde de potassium.....	40 g
Eau distillée.....	100 ml

▪ **VP 2 :**

Alpha naphthol.....	6 g
Ethanol	100 ml

- **Réactif Kowacks** : pour la recherche de l'indole.

-Paradeethylamino benzaldéhyde.....5 g
-Alcool amylique.....75 ml
-HCl pur.....25 ml

- **Rouge de méthyle** :

-Rouge de methyle.....0 ,5 g
- Alcool éthylique a 60°100 ml

Colorants:

- **Lugol** : Elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer le colorant

-Iode.....1g
-Iodure de potassium.....2g
- Eau distillée.....3g

- **Violet de Gentiane** : Elle est utilisée pour colorer les bactéries.

-Violet de gentiane.....1g
-Ethanol à 90%.....1ml
-Phénol.....2g
-Eau distillée.....100 ml

- **Fuchsine de Ziehl** :

-Fuchsine basique.....1g
-Alcool éthylique.....100 ml
-Phéno.....15 g
-Eau distille.....100 ml

Annexe II :

Tableau 01 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E [15]

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D- Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Negative	Positive
			incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ICTI	Sodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production de H ₂ S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
VP1	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
GELI	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/vertjaune
MAN	Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	Sucrose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	Mlebiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
NO₃-NO₂	GLU tube	Production de NO ₂ réduction N ₂ gaz	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge

Tableau 02 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph [16].

Tests	substrats	Caractère recherché	Résultats		
			Négative	Positive	
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-	
GLU	D-glucose	Témoin négatif	Rouge	Jaune	
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate			
MNE	D-mannose				
MAL	Maltose				
LAC	Lactose				
TRE	D-tréhalose				
MAN	D-mannitol				
XLT	Xylitol				
MEL	D-melibiose				
NIT	Nitrate de potassium				Réduction des nitrates en nitrites
				Incolore/Rose	Rouge
PAL	β -naphtylac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn		
			Jaune	Violet	
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn		
			Incolore/rose	Violet/rose	
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune	
XYL	Xylose				
SAC	Saccharose				
MDG	α -méthyle-D- glucosamine				
NAG	N-acétyl-glucosamine				
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge	
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet	

Tableau 03 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API strep [17].

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2/ jusqu'à 10 mn	
			Incolore	Rose/rouge
HIP	Acide hippurique	hydrolyse	NIN/ jusqu'à 10 mn	
			Incolore/Bleu pâle	Bleu foncé/violet
ESC	Esculine Citrat de fer	Hydrolyse β -glucosidase	Incolore/ jaune	pâle Noir/gris
PYRA	Acide pyroglutamique- β -naphtylamide	PYRrolidonylArylamidase	ZYM A+ZYM B/10mn	
			Incolore/orange pâle	orange
αGAL	6-bromo-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	α -GALactoside	Incolore	Violet
βGUR	Acide naphthol-ASBgalactopyranoside	β -GLUCuronidase	Incolore	Bleu
βGAL	2-naphtyl- β Dgalactopyranoside	β - GALactoside	Incolore ou violet pâle	Violet
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase Alcaline	Incolore ou violet pâle	Violet
LAP	L-leucine- β -naphtylamine	Leucine AminoPeptidase	Incolore	orange
ADH	L-arginine	Arginine DIHydrolase	Jaune	Rouge
RIB	D-ribose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
ARA	L-arabinose			
MAN	D-mannitol			
SOR	D-sorbitol			
LAC	D-lactose			
TRE	D-thréhalose			
INU	Inuline			
RAF	d-raffinose			
AMD	Amidon			
GLYG	glycogène			

Tableau 04 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE [18].

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			Incolore	Rose/rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 mn	
			Incolore	Rose
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
				Incolore
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-Nitro-phényle-βD-Galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-p-phenylène diamine			

Tableau 05: Diamètres des zones d'inhibition obtenues (mm) de l'antibiogramme des souches étudiées.

Antibiotiques	P10	E15	L10	AMC30	TE30	VA30	B8	C30
Espèces								
<i>Micrococcus</i> spp. (fig.65)	35	22	23	31	/	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> (fig.66)	41	6	29	35	/	/	/	/
<i>Pseudomonas luteols</i>	6	9	/	6	30	/	/	/
<i>Aeromonas hydrophila</i> (A1)	6	6	6	15	/	/	/	/
<i>Salmonella</i> spp. (S2) (fig.67)	6	6	6	20	/	6	/	/
<i>Serratia odoriferae</i> (fig.68)	6	6	6	9	/	6	/	/
<i>Vibrio alginolyticus</i>	6	/	18	9	32	13	/	/
<i>Enterococcus faecium</i> (fig.69)	29	22	14	27	31	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i> (fig.70)	7	6	6	11	/	15	/	/
<i>Pantoea</i> spp. 2 (fig.71)	6	15	13	6	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> (fig.72)	6	6	6	9	/	/	/	/
<i>Enterobactr sakazakii</i> (fig.73)	6	6	6	15	/	6	/	/
<i>Raoultella terrigena</i> (fig.74)	6	6	/	17	/	/	/	/
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	20	/	6	35	/	/	/
<i>Vibrio fluviatus</i>	42	/	/	/	37	/	21	35
<i>Escherichia coli</i> 1	9	/	/	/	37	/	8	31
<i>Salmonella</i> spp. (S1)	6	/	/	/	/	/	6	/
<i>Citrobacter braakii</i>	6	/	/	/	28	/	6	33
<i>Pantoea</i> spp.	18	/	/	/	38	/	23	35
<i>Citrobacter freundii</i>	22	/	/	/	34	/	17	40

Tableau 6 : les normes de la qualité microbiologique des poissons (Jouve, 1996).

Poissons, produits de la pêche, produits dérivés		n	c	m	M	Etape d'application du critère
Poissons frais ou congelés	<i>E. coli</i>	5	1	10 UFC/g	100 UFC/g	Consommation
	Coliformes 44°C	5	2	=	=	Consommation
	Staphylocoques coagulase positive	5	2	100 UFC/g	1.103 UFC/g	Consommation
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	Abs/25g		Consommation

Tableau 07 : Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) des souches de références utilisées obtenus par diffusion en gélose [33].

Antibiotiques	Charge du disque	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>S.aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
Pénicilline G	10 µg	–	–	31,0 – 38,5	–
Amoxiciline	30 µg	22.0– 26.5	–	–	–
Erythromycine	15 UI	–	–	26,5 – 31,5	14– 22
Lincomycine	10 µg	–	–	24,5 – 29,5	–
Tétracycline	30 µg	–	–	–	15–18
Vancomycine	30 µg	–	–	17.5– 20.5	–

Résumé

La présente étude consiste à isoler et à identifier les bactéries présentes chez le carassin commun *Carassius carassius* peuplant les eaux du canal Messida (situé dans le PNEK –Nord-Est Algérien) au niveau de trois parties : Branchie, mucus et chair durant deux mois (Février et Mars 2015). Trois stations d'échantillonnage s'étendent de l'exutoire du lac Tonga jusqu'à l'embouchure ont été choisies le long du canal Messida en fonction de l'implantation des sources de contamination.

La résistance aux antibiotiques fréquemment utilisés en médecine vétérinaire et en médecine humaine a été testée sur les souches bactériennes isolées des poissons étudiés.

L'examen externe des poissons a montré une prévalence globale de poissons atteints de lésions externes égale à 18.66%.

Les analyses bactériologiques ont confirmé la présence de plusieurs genres bactériens : 31 souches bactériennes ont été identifiées, 19 sont des entérobactéries, 04 *Aeromonas*, 02 vibrions non cholériques, 02 *Pseudomonas*, 01 *Pasteurella*, 01 staphylocoque, 01 entérocoque, et un microcoque.

La résistance aux antibiotiques a révélé la présence de plusieurs profils de résistance :

Les souches d'entérobactéries sont résistantes à 100%, à la Pénicilline, à l'Erythromycine, et au Lincomycine, 85.71% à l'Amoxicilline et quatre souches sont résistantes au Vancomycine et, au Bacitracine. Une souche de *vibrio* est résistante à la Pénicilline, l'Amoxicilline, Lincomycine et Vancomycine, et la souche d'*Aeromonas hydrophila* est résistante à l'Amoxicilline et à la Pénicilline.

Deux souches de *Pseudomonas* sont résistantes à l'ampicilline et l'amoxicilline, et une souche d'entérocoque est résistante à l'Erythromycine, Lincomycine et l'Amoxicilline. La bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* a résisté seulement à l'Erythromycine.

Les résultats obtenus confirment que les carassins communs du canal Messida constituent un risque pour la santé publique lorsqu'ils ne sont pas bien cuits.

Mots clés : souches bactériennes, Carassin carassius, canal Messida, résistance aux antibiotiques.

Summary

The aim of This study is the isolation and identification of the bacteria present in the *Crucian carp* inhabiting the waters of Messida channel (situated in the PNEK -North-Eastern of Algeria) at three parts : Gill, mucus and flesh for two months (February and March 2015).

Three sampling stations extending from the outlet of Lake Tonga to the mouth were selected along oued Messida depending on the location of sources of contamination.

The bacteria isolates from isolated fish studied were tested for susceptibility to antibiotics used in veterinary medicine and in human medicine.

The external examination of fish showed an overall prevalence of fish suffering from external lesions equal to 18.66%.

Bacteriological analyzes confirmed the presence of several bacterial : 31 bacterial strains were identified, 19 are enterobacteria, 04 *Aeromonas*, 02 non-cholera *vibrio*, 02 *Pseudomonas*, 01 *Pasteurella*, 01staphylococci, 01 *Enterococcus*, and 01 micrococcus.

Antibiotic resistance revealed the presence of several resistance patterns :

Enterobacteria are 100% resistant to Penicillin, Erythromycin, and to Lincomycin, 85.71% to Amoxicillin and four strains are résistant to Vancomycin and Bacitracin. A strain of *Vibrio* is resistant to penicillin, amoxicillin, Lincomycin and Vancomycin, and the strain *Aeromonas hydrophila* is resistant to amoxicillin and penicillin.

Two *Pseudomonas* strains are resistant to ampicillin and amoxicillin, and *Enterococcus* strain is resistant to Erythromycin, Lincomycin and Amoxicilline. The Pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* resisted only to erythromycin.

The results confirm that the crucian carp captured from Messida channel constitutes a risk to public health if they are not properly cooked.

Keywords: bacterial strains, *Crucian carp*, Messida channel, antibiotic resistance.

ملخص

هذه الدراسة تهدف إلى عزل وتحديد البكتيريا الموجودة في نوع *Carassius carassius* الذي يقطن مياه قناة مسبدة (الموجودة في الحظيرة الوطنية للقالبة شمال شرق الجزائر) على مستوى ثلاثة أجزاء: غلاصم، مخاط ولحم مدة شهرين (فيفري ومارس 2015). تم اختيار ثلاث محطات لأخذ العينات تمتد من مخرج بحيرة تونغا إلى الفم على طول قناة مسبدة اعتمادا على موقع مصادر التلوث.

من خلال السلالات البكتيرية المعزولة من السمك التي تمت دراستها قبل بدراسة مقاومتها للمضادات الحيوية التي يتم استعمالها في الطب البيطري والطب البشري.

أظهر الفحص الخارجي للأسماك معدل انتشار معاناة الأسماك من الأفات الخارجية تساوي 18.66%.

أظهرت التحاليل البكتريولوجية وجود عدة أجناس بكتيرية: ما بين 31 سلالات بكتيرية معزولة، 19 كانت المعوية

Pseudomonas 02 ، *Vibrions* 02 ، *Aeromonas* 04 ، entérobactérie

01 مكورة عنقودية (staphylocoques) ، نوع من المكورات العنقودية (entérocoque)

Pasteurella 01 ، ووجود مكورة (microcoque) .

وقد تم الحصول على سلالات من البكتيريا المعوية مقاومة 100% للبنسلين، للاريثروميسين و للنكوميسين، 85.71%

للاموكسيسيلين 04 سلالات مقاومة للفانكوميسين وللبا ستراسين. السلالة من البكتيريا *Vibrio* مقاومة للبنسلين،

للاموكسيسيلين، للنكوميسين و للفانكوميسين ، والسلاسة من البكتيري *Aeromonas hydrophyla* مقاومة

للاموكسيسيلين والبنسلين.

السلالتين من البكتيريا *Pseudomonas* مقاومة للبنسلين وللاموكسيسيلين والسلالة من المكورات العنقودية

مقاومة الاريثروميسين، للنكوميسين و الاموكسيسيلين. أما بالنسبة للبكتيريا الممرضة المكورة العنقودية الذهبية

(*Staphylococcus aureus*) مقاومة فقط للاريثروميسين.

تؤكد النتائج المتحصل عليها أن *Carassius carassius* موجود في قناة مسبدة تشكل خطرا على الصحة العامة إذا

لم يتم طهيها بشكل صحيح.

الكلمات الرئيسية: سلالة بكتيرية ، *Carassius carassius* ، قناة مسبدة، مقاومة المضادات الحيوية.

