

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME De Master EN SCIENCES
DE LA MER

Option : Aquaculture

Sujet :

**Recherche de germes responsables d'infections
microbiennes chez les poissons d'ornement**

Présenté par :

DJENDEL youcef

MAKHLOUF zakaria

Soutenu le 26/10 /2013 devant le jury suivant :

Dr. BELHASSNAT.K	Maître de conférences (A)	ENSSMAL	Président
Dr. GRIMES.S	Maître de conférences (A)	ENSSMAL	Examineur
Dr. AMROUCHE.L	Maître de conférences (A)	ENSSMAL	Examinatrice
M. DJEGHRI H.B	Professeur	ENSSMAL	Promotrice

Promotion : 2012-2013

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos gratitudee à toutes les personnes ayant contribué, chacune à sa manière, pour le bon déroulement de notre travail, et à la réalisation de ce modeste mémoire.

On remercie **Mme Djeghri.B**, qui a encadré ce travail, pour sa présence continue, son aide, ses précieux conseils et ses recommandations.

Nous tenons à remercier Mr le président **Belhasnat.K** d'avoir accepté la présidence du jury de cette soutenance.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions **Mr.Ghrimes** et **Mme. Amrouche** Pour avoir pris le temps d'examiner ce travail, pour ses critiques constructives.

Nos remerciements vont également aux ingénieurs et aux techniciens de l'ENSSMAL en particulier Mr. Matouk et Mme.Reffas, qui ont ménagé leurs efforts pour la bonne marche de la présente étude.

On tient à exprimer notre haute considération et sincères remerciements à l'ensemble des travailleurs de l'ENSSMAL.

On tient à exprimer nos vives gratitudee à tous nos enseignants, depuis la première année fondamentale de notre formation, jusqu'à la cinquième année universitaire.

Nos remerciements du cœur s'adressent vivement à tous ceux qui ont contribué de façon directe ou d'une façon indirecte à l'achèvement et à la réalisation de notre mémoire de fin d'études.

Sommaire

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre premier : Généralité	
I.1. Problèmes de pathologies en aquaculture.....	2
I.2. Maladies infectieuses en aquaculture.....	2
I.2.1. Infections bactériennes.....	3
I.3. Origine et histoire du poisson rouge.....	6
I.3.1. Taxonomie des poissons rouges.....	6
I.3.2. Variétés des poissons rouges.....	7
I.3.3. Caractères morphologiques de l'espèce.....	7
I.3.4. Ecologie et biologie.....	8
I.3.5. Reproduction.....	8
I.3.6. Alimentation.....	10
I.4. Généralité sur le genre <i>Vibrio</i>.....	10
I.4.1. Ecologie.....	11
I.4.2. Taxonomie.....	11
I.4.3. Pouvoir pathogène des <i>Vibrio</i>.....	13
I.5. Généralité sur le genre <i>Aeromonas</i>.....	13
I.5.2. Pouvoir pathogène des <i>Aeromonas</i>.....	13
I.6. Généralité sur le genre <i>Pseudomonas</i>.....	14
I.6.1. Ecologie et biologie des <i>Pseudomonas</i>.....	14
I.6.2. Taxonomie des <i>Pseudomonas</i>.....	15
I.6.3. Pouvoir pathogène des <i>Pseudomonas</i>.....	16
I.7. La maladie de saprolégniose chez les poissons.....	17
I.7.1. Les caractéristiques de la Saprolégniose.....	17
I.7.2. Classification des espèces de <i>Saprolegnia</i>.....	17

Sommaire

I.7.3. Mode d'infection.....	18
------------------------------	----

Chapitre deuxièmes : Matérielles et méthodes

II.1. Cadre d'étude.....	20
II.2. Matériel biologique.....	20
II.2.1. Site de prélèvement.....	20
II.2.2. échantillonnage.....	20
II.2.3. Aspect général externe des poissons.....	20
II.2.4. Préparation de l'échantillon.....	21
II.2.4.1. Préparation des milieux de culture.....	21
II.2.4.2. Prélèvement bactériologique.....	22
II.2.4.3. Mises en culture des germes.....	22
II.2.4.4. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
II.2.4.4.1. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur les milieux King A et B.....	22
II.2.4.5. Recherche des <i>Vibrio</i>	23
II.2.4.6. Recherche d' <i>Aeromonas</i>	24
II.2.4.6.1. Recherche d' <i>Aeromonas</i> sur la gélose Columbia au sang.....	24
II.2.4.7. Recherche de la flore fongique.....	24
II.2.5. Isolement et purification des souches.....	25
II.2.5.1. Essai de l'obtention de souches pures.....	25
II.2.6. Tests de caractérisation.....	26
II.2.6.1. Tests complémentaires pour la caractérisation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
II.2.6.2. Test d'anaérobiose pour le genre <i>pseudomonas</i>	27
II.2.6.3. Tests complémentaires pour la recherche d' <i>Aeromonas</i> (Clave, 2010).....	27
II.2.7. Techniques d'identification bactérienne.....	27
II.2.7.1. Technique de coloration de Gram.....	27
II.2.7.2. Recherche de la réaction de l'oxydase.....	28
II.2.7.3. Recherche de la catalase.....	29

Chapitre troisième : Résultat et discussion

III.1. Résultats et discussion de la recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
III.1.1. Résultats et discussion du test de fluorescence sous UV.....	31
III.1.2. Résultats et discussion de l'incubation des boîtes à 41°C.....	31

Sommaire

III.1.3. Résultats et discussion du test d'anaérobiose des tubes King A et King B.....	31
III.1.4. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu Muller-Hinton.....	32
III.1.5. Résultats et discussion des réactions oxydase et catalase des souches.....	33
III.1.5. Résultats et discussion de la coloration Gram.....	33
III.2. Résultats et discussion de la recherche du genre <i>Vibrio</i>	36
III.2.1. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu Hektoen.....	36
III.2.2. Résultats et discussion des réactions d'oxydase et catalase.....	36
III.2.3. Résultats et discussion de la coloration de Gram.....	37
III.3. Résultats et discussion de la recherche du genre <i>Aeromonas</i>	38
III.3.1. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu S-S.....	39
III.3.2. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu PCA hypersalée (6,5 %) de NaCl.....	40
III.3.3. Résultats et discussion du caractère psychrophile des souches du genre <i>Aeromonas</i>	40
III.3.4. Résultats et discussion des réactions d'oxydase-catalase.....	40
III.3.5. Résultats et discussion de la coloration de Gram.....	40
III.4. Résultats et discussion de la recherche de la flore fongique.....	42
Conclusion.....	43
Bibliographies.....	44
Annexe	

**Liste des abréviations, liste des
tableaux, liste des figures**

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

AFNOR : Association Française de la Normalisation.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : aliment, environnement, travail.

Cm : centimètre.

EPI : Eau peptonée exempte d'indole.

EPT : Eau peptonée tamponnée.

EPSA : Eau peptonée saline alcaline.

FAO: Food and Agriculture Organization of United Nations.

g: gramme

G(-) : Gram négatif

G(+): Gram positif

Kg: kilogramme

ml: millilitre

min: minute

NPP: Nombre le plus probable.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

PCA: Plate Count Agar.

pH: Le potentiel d'Hydrogène.

Sec: seconde

SS: Gélose Salmonella-Shigella.

TCBS: Gélose au Thiosulfate au Citrate, à la Bile et au Saccharose.

CS : Gélose Columbia au sang.

KA : Gélose King A.

KB : Gélose King B.

M.H : Gélose Muller-Hinton.

P : Peau.

B : Branchies.

V : Viscère

LISTE DES TABLEAUX

Tableau (1) : Principales maladies bactériennes rencontrées en aquaculture marine dans le monde.Håstein.....	5
Tableau (2) : Besoin écologique et caractéristique biologique des poissons rouges. L'Association Française du Poisson Rouge, 2013.....	8
Tableau(3): Les espèces appartenant actuellement au genre <i>Pseudomonas</i> (Euzeby, 2008 in Peix <i>et al</i>, 2009).....	16
Tableau (4) : Résultat des tests de l'oxydase et catalase et observation microscopique des souches du genre <i>Pseudomonas</i> sur les milieux King A et King B.....	34
Tableau (5) : Résultat de test de l'oxydase et catalase et observation des souches de <i>Vibrio</i> présumé en microscope photonique.....	37
Tableau (6) : Résultat des tests de l'oxydase et catalase et observation microscopique des souches du genre <i>Aeromonas</i> présumées.....	40

LISTE DES FIGURES

Figure (1) : poisson rouge commun <i>Carassius auratus auratus</i> (Linnaeus, 1758).....	6
Figure (2): poisson rouge (tête de lion) <i>Carassius auratus</i> sp. 'Pingxiang' (Linnaeus, 1758).....	7
Figure (3): Alevins de poisson rouge. http://Wikipedia	10
Figure(4) : Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences concatémérisées 16S rRNA, recA et rpoA (2,898 bp), mettant en évidence différents groupes de <i>Vibrio</i> (Thompson et al. 2004a).....	12
Figure (5) : Arbre phylogénétique de <i>Saprolegnia parasitica</i> (Jessica Seenevaragachetty. 2001).....	18
Figure (6) : Poisson infecté (Aquicole Octobre 2005).....	19
Figure (7) : Observation macroscopique des souches de <i>Pseudomonas</i> qui poussent sur les milieux King A et King B.....	30
Figure (8) : Observation de la fluorescence à l'UV sur King A et King B.....	31
Figure(9) : Observation des tubes de test d'anaérobiose sur King A et King B.....	32
Figure(10) : Observation sous UV des souches qui poussent sur le milieu Muller-Hinton.....	33
Figure (11) : Coloration de Gram des colonies sur milieu King A et King B Gx100.....	35
Figure (12) : Observation macroscopique des souches de <i>vibrio</i> qui poussent sur milieu TCBS.....	36
Figure (13) : Coloration de Gram des colonies sur milieu TCBS avec Gx100.....	38
Figure (14) : Observation macroscopique des souches d' <i>Aeromonas</i> qui possent sur milieu Columbia au sang.....	39
Figure (15) : Coloration de Gram des colonies sur milieu Columbia au sang avec Gx100.....	42
Figure (16) : Observation macroscopique des souches fongiques qui poussent sur milieu Sabouraud.....	42

Introduction

Introduction

Dans le secteur aquacole, les produits issus de cette activité ne sont plus exclusivement destinés à la consommation humaine, à titre d'exemple l'aquariophilie (élevage des poissons d'ornement) est devenue très importante comme activité commerciale vu sa rentabilité économique.

Les poissons d'ornement d'eau douce sont de plus en plus populaires, mais à cause des conditions de vie qui leur sont imposées dans un aquarium ou un bassin, il est fréquent que des maladies et troubles pathologiques apparaissent. Celles-ci sont, pour une grande part, des parasitoses qui engendreront ensuite des infections secondaires bactériennes, virales et infections cutanées par des moisissures.

Les infections liées aux germes bactériens provoquent de violents troubles pathologiques pour les sujets atteints ; lésions, sépticémies, hémorragies et nécroses, le risque de mortalité est plus que probable si les germes bactériens s'associent causant des traumatismes létaux pour les individus malades.

Jusqu'à maintenant, les vétérinaires n'arrivent pas à donner un diagnostic précis concernant l'ichtyopathologie, ceci est lié à la difficulté d'identifier l'agent étiologique responsable des premiers syndromes qui apparaîtront suite à l'infection et de connaître les mécanismes de transmission et /ou l'épidémiologie dès lors le traitement est si délicat que les vétérinaires recommandent la prévention et la prophylaxie.

Dans le cadre de notre présente étude nous avons tenté de rechercher des germes microbiens pathogènes causant en cas d'infection de graves troubles pour les poissons atteints il s'agit des souches des genres : *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* et la flore fongique.

La recherche et la mise en évidence de ces germes étaient effectuées en appuyant sur la lecture des résultats de plusieurs tests de caractérisation .Ces tests devraient confirmer ou infirmer l'existence de ces micro-organismes pathogènes.

Chapitre premier

Généralités

"Une jeunesse qui ne crée pas est une anomalie"

G. GUEVARA

I.1. Problèmes de pathologies en aquaculture :

Le développement des maladies dans les élevages aquacoles reste une préoccupation majeure à laquelle aucune filière aquacole n'échappe aujourd'hui. Les pertes annuelles liées aux maladies en aquaculture sont estimées à 3 milliards de dollars US (**Subasinghe, et al, 2001**). Si tous les épisodes de mortalité ne sont pas systématiquement l'expression d'une maladie, la plus large majorité relève de pathologies d'étiologies diverses. Le développement spectaculaire de l'aquaculture ces dernières décennies a été particulièrement propice à l'apparition de maladies:

1. l'intensification des systèmes de production frisant dans certains cas le productivisme déraisonné et dépassant les niveaux de résistance des écosystèmes.
2. la mondialisation des échanges commerciaux internationaux.
3. l'impact anthropique sur l'environnement, la pollution et le réchauffement global, sont autant de facteurs contraignant les conditions d'élevage et favorisant l'apparition de mortalité ainsi que l'extension, la dissémination, l'émergence ou la réémergence d'organismes pathogènes à l'échelle globale (**Harvell, et al, 1999; Harvell, et al, 2002; Murray et Peeler, 2005; Saulnier, et al, 2007; Igbiosa et Okoh, 2008**).

I.2. Maladies infectieuses en aquaculture :

Parmi les causes identifiées, celles responsables des plus grosses pertes en aquaculture sont les maladies infectieuses, elles sont à l'origine de conséquences économiques et sociales parfois dramatiques, pouvant aller jusqu'à la faillite de l'entreprise aquacole voire de l'ensemble de la filière.

En plus de la chute des taux de survie dans les élevages conduisant à l'élimination d'une partie ou de la totalité des cheptels, les maladies infectieuses peuvent également influencer sur la croissance des animaux, sur leur aspect physique et donc leur commercialisation, aussi bien que sur les performances de production entraînant des rendements et des productions déficitaires.

I.2.1. Infections bactériennes :

Les infections concernent essentiellement les germes suivants :

Famille des vibrionacés : Vibrio anguillarum

C'est l'agent responsable de la vibriose. Cette maladie est largement répandue dans le monde. Elle est commune à de nombreuses espèces de poissons de mer sauvages (hareng, morue, turbot, sole), ainsi qu'à des poissons de mer en élevage dont les salmonidés, parmi lesquels la plupart des saumons et des truites. Elle est essentiellement une maladie des poissons en mer, elle peut atteindre exceptionnellement les poissons d'eau douce, comme le brochet ou la truite, à condition qu'ils aient eu un contact soit par l'alimentation soit par le milieu avec des poissons de mer infectés. **(Ifremer, 1986).**

Famille d'Aeromonacés : Aeromonas salmonicida

C'est l'agent de la furunculose est une des principales causes de mortalité des salmonidés d'élevage **(Stoskopf, 1992)**. Cette maladie systémique, causée par la bactérie à Gram négatif *Aeromonas salmonicida*, peut se présenter sous formes aiguë et chronique. La première forme se traduit par une septicémie, visible par des signes d'hémorragies cutanées et au niveau des organes internes. La forme aiguë engendre des taux importants de mortalité en l'espace de quelques jours. La seconde forme, dite chronique, est caractérisée par l'apparition de lésions sous-cutanées et cause moins de mortalité mais rend le poisson impropre à la commercialisation **(Austin et Austin, 1987; Uhland et al, 2000)**.

Famille des Entérobactéries : Yersinia ruckeri

Cette bactérie provoque la Yersiniose ou maladie de la bouche rouge, La Yersiniose entraîne l'apparition de lésions hémorragiques dont la localisation à la tête et à la bouche est typique, d'où la dénomination de maladie de la bouche rouge. Localisée aux élevages de truites en eau douce, où son incidence et son extension géographique très rapide en font l'un des problèmes pathologiques essentiels, la Yersiniose a été isolée sporadiquement dans un élevage de turbots. Aussi il possède un pouvoir pathogène pour d'autres espèces de poissons marins d'élevage (le bar, la sole et la daurade, ainsi que pour la truite élevée en mer). **(Ifremer, 1986)**.

Famille des Corynébactéries : Renibacterium salmoninarum

C'est l'agent de la corynébactériose ou maladie bactérienne du rein. La corynébactériose est mise en évidence par l'observation de bactéries en grand nombre sur des frottis ou des calques d'organes de poissons malades colorés au Gram.

Les principales modifications lésionnelles qu'elle entraîne sont une hypertrophie du rein postérieur accompagnée souvent d'ascite abdominale, d'abcès et de fausses membranes sur les principaux organes internes. La Corynébactériose n'affecte que les salmonidés. En France, son apparition en 1974 a suivi de quelques années l'importation d'œufs de saumons coho. Elle existe maintenant à l'état chronique dans l'ensemble de leurs élevages, mais aussi de façon occasionnelle chez la truite arc-en-ciel. (**Vigneulle, 1981**). Son expression en mer n'est que le prolongement de sa présence en eau douce. (**Ifremer, 1986**).

Tableau (1) : Principales maladies bactériennes rencontrées en aquaculture marine dans le monde. Håstein.1994.

Agents pathogènes	Hôtes	Maladies	Environnement
<i>Vibrio anguillarum</i>	Nombreuses espèces de poissons	Vibriose	Monde entier, eaux saumâtres, eau de mer. Austin et Austin, (1993).
<i>Vibrio salmonicida</i>	Saumon atlantique, Morue	Vibriose des eaux Froides	Europe, côte orientale de l'Amérique du Nord, eau de mer. Inglis ; Roberts ; Bromage, (1993).
<i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>A. salmonicida</i> atypique	Salmonidés, turbot, "green flounder"	Furonculose	Large distribution, eaux douces, eau de mer. Whittington ; Djordjevic ; Carson ; Callinan, (1995).
<i>Pasteurella piscicida</i>	Sériole, bar, bar d'Amérique, dorade, tambour rouge	Pasteurellose	Eaux douces, eau de mer. Inglis ; Roberts ; Bromage, (1993).
<i>Streptococcus</i> spp.	Nombreuses espèces de Poissons	Streptococcose	Eaux douces, eau de mer. Austin et Austin, (1993).
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Salmonidés	Rénibactériose	Amérique du Nord, Europe, eaux douces, eau de mer. Inglis ; Roberts ; Bromage, (1993).
<i>Mycobacterium</i> spp.	Nombreuses espèces de Poissons	"Tuberculose" des Poissons	Eaux douces, eau de mer. Baltar, (1994).
<i>Piscirickettsiasalmonis</i>	Saumon atlantique, saumon du Pacifique, truite arc-en-ciel	Piscirickettsiose	Côte pacifique des États-Unis, Europe, eaux douces, eau de mer. Inglis ; Roberts ; Bromage, (1993).

I.3. Origine et histoire du poisson rouge :

Les poissons rouges sont originaires des rivières, lacs et étangs de Chine où leur domestication est déjà mentionnée en 970 avant Jésus Christ. Avant le XVI^e siècle, seuls les nobles les élevaient. Les poissons rouges étaient particulièrement vénérés sous la Dynastie Song (960-1279). Ils ont tout d'abord été conservés dans de riches bocaux de porcelaine puis dans des sphères de cristal **Axelrod, et al, (1977)**.

I.3.1. Taxonomie des poissons rouges :

Règne : Animalia.

Embranchement : Chordata.

Classe : Actinopterygii.

Ordre : Cypriniformes.

Famille : Cyprinidae.

Genre : Carassius.

Espèce : *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758).

Sous-espèce : *Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758) : poisson rouge commun.



Figure (1) : poisson rouge commun *Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758).

I.3.2. Variétés des poissons rouges :

Toutes sortes de variétés colorées sont apparues, de même que des mutations plus importantes au niveau de la forme du corps, très recherchées chez ces poissons ornementaux.

Après plusieurs croisements et sélections, de nouvelles variétés ont été créées, comme l'oranda, la comète, le télescope, la tête de lion, l'uranoscope...etc. Dans ces cas, les couleurs mais aussi la morphologie des poissons ont été considérablement modifiées par mutations progressives. Les poissons peuvent avoir un corps plus rond, une queue double voire triple, des excroissances sur la tête, une nageoire dorsale plus haute. Il existe de nombreuses variétés dites de « poissons rouges ». (Anonyme1).

I.3.3. Caractères morphologiques de l'espèce :

Le poisson rouge commun est caractérisé par un corps allongé, la queue et les nageoires petites par rapport au corps. La coloration est dans le rouge, l'orange, l'or, le blanc, le noir et le jaune.

La tête de Lion n'a pas de nageoire dorsale et a une excroissance sur toute la tête, pouvant faire penser à une crinière de lion. La coloration est : rouge, orange, or, blanc, jaune.



Figure (2): poisson rouge (tête de lion) *Carassius auratus* sp. 'Pingxiang' (Linnaeus, 1758).

I.3.4. Ecologie et biologie :

Le poisson rouge est un animal domestique très apprécié pour sa facilité d'adaptation à l'environnement et sa maintenance aisée. En effet, c'est une espèce très résistante. L'espérance de vie d'un poisson rouge est de trente ans, du moins tant qu'elle est maintenue dans de bonnes conditions. **(Anonyme 2).**

Ce sont des poissons d'eau froide, mais ils peuvent être maintenus à des températures allant de 1 °C à 27 °C pour les poissons rouges communs (22 °C pour la reproduction). Pour les variétés dérivées comme la queue de voile, télescopes, oranda, tête de lion, bubbleeyes... qui sont plus délicates, la température doit être comprise entre 10 °C et 26 °C.

L'eau doit avoir un pH plutôt neutre à alcalin (basique) compris entre 7,0 à 8,0, et une dureté de 5 °d GH à 15 °d GH. **(Anonyme 3).**

Tableau (2) : Besoin écologique et caractéristique biologique des poissons rouges.

Anonyme 3.

Eau	Eau douce
pH	7 à 8
Dureté de l'eau	5 à 15 °GH
Volume minimum	250 l pour 3 à 4 poissons
Température	1 à 30 °C
O₂dissous	1 à 2 mg/l
Taille adulte	10 à 30 cm
Alimentation	Omnivore
Reproduction	Ovipare
Sociabilité	Vit en groupe
Zone occupée	pleine eau
Difficulté (élevage)	Facile

I.3.5. Reproduction :

Au printemps, quand l'eau atteint 14 à 16 °C, les poissons rouges s'apprêtent à se reproduire. En aquarium il est nécessaire de baisser la température durant l'hiver si on souhaite tenter une reproduction car le cycle de maturation doit passer par une phase de dormance.

Le mâle atteint sa maturité sexuelle à deux ans et la femelle à trois ans. Les femelles sont plus rondes et plus pleines que les mâles quand arrive la période de frai. On reconnaît qu'elles sont prêtes à pondre car le ventre devient mou et l'orifice génital paraît proéminent. À cette période les mâles libèrent facilement de la laitance lorsqu'ils sont manipulés. Ils portent des « boutons de noce » blancs et rugueux sur les opercules ainsi que sur le premier rayon des nageoires pectorales qui sont souvent plus développées que chez les femelles.

La reproduction est appelée « le frai ». La femelle accompagnée de plusieurs mâles prend appui sur les supports (frayères) disponibles pour pondre. Les ovules et la laitance sont libérés en pleine eau et c'est à ce moment que doit avoir lieu la fécondation. Au contact de l'eau, les protéines qui couvrent l'œuf commencent à devenir adhésives, l'œuf s'hydrate et se gonfle, et le micropyle se referme. Les ovules qui n'ont pas été fécondés à ce stade sont perdus. Les œufs adhèrent alors aux végétaux et aux surfaces environnantes. L'incubation peut commencer. Les œufs qui sont trop agglomérés les uns aux autres, tombés au sol ou dans une chose réduit mal oxygéné risquent fort d'être perdus par manque d'oxygène ou au contact pathogène.

L'éclosion des œufs restant a lieu après moins d'une semaine. La durée de l'embryogénèse est proportionnelle à la température et peut demander de six à trois jours dans une eau respectivement de 16 à 24 °C. À l'éclosion, les extrémités de l'appareil digestif (bouche et anus) de la larve ne sont pas encore ouvertes, mais celle-ci dispose d'une réserve vitelline qui lui apporte l'énergie et les nutriments nécessaires pour achever sa formation.

Cependant, n'ayant pas encore de vessie natatoire, la larve coule et ne peut tenir en eau sans fournir un effort considérable. Elle cherche donc à s'accrocher aux supports qu'elle trouve. Cette période dite de résorption de la vésicule peut demander deux à quatre jours (toujours selon la température).

Dès qu'elle en est capable, la larve vient à la surface capter une bulle d'air qui vient gonfler sa vessie natatoire et lui permet ainsi de nager normalement. À partir de ce moment, elle doit commencer à se nourrir (infusoires, rotifères, débris végétaux...). **Bourgeois, 1976.**



Figure (3): Alevins de poisson rouge. <http://Wikipedia>.

I.3.6. Alimentation :

Ce poisson est omnivore. Dans les étangs, les mares et les bassins mixtes (eau et plantes) pas trop peuplés, il trouve en principe de la nourriture vivante et végétale en quantité suffisante. En bassin surpeuplé, en vivier et en aquarium. De la nourriture du commerce adaptée est donnée aux poissons.

Il est généralement conseillé de ne nourrir les poissons rouges que deux fois par semaine maximum. On peut adapter ainsi la ration en fonction des poissons, de leur taille, leur nombre, leur appétit, la température. Le menu peut être complété par de la verdure (salade pochée, épinard, courgette...) par de la nourriture vivante et/ou congelée (artémies, vers de vase rouges, larves de moustiques...). **Lacroix, 2011.**

I.4. Généralité sur le genre *Vibrio* :

Les bactéries du genre *Vibrio* appartiennent à la classe des γ -*Proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae* décrite par **Véron en 1965 (Véron, 1965)**. Le genre *Vibrio* est un genre essentiellement aquatique et principalement marin. Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8 μm et d'une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 μm . Toutes les espèces de *Vibrio*, à l'exception de *Vibrio metschnikovii* et de *Vibriogazogenes*, sont positives pour le test de l'oxydase. Ils sont aéro-anaérobies, possédant un métabolisme respiratoire et fermentatif. La plupart des espèces fermentent le glucose, sans production de gaz. Les *Vibrio* présentent une mobilité due à un ou

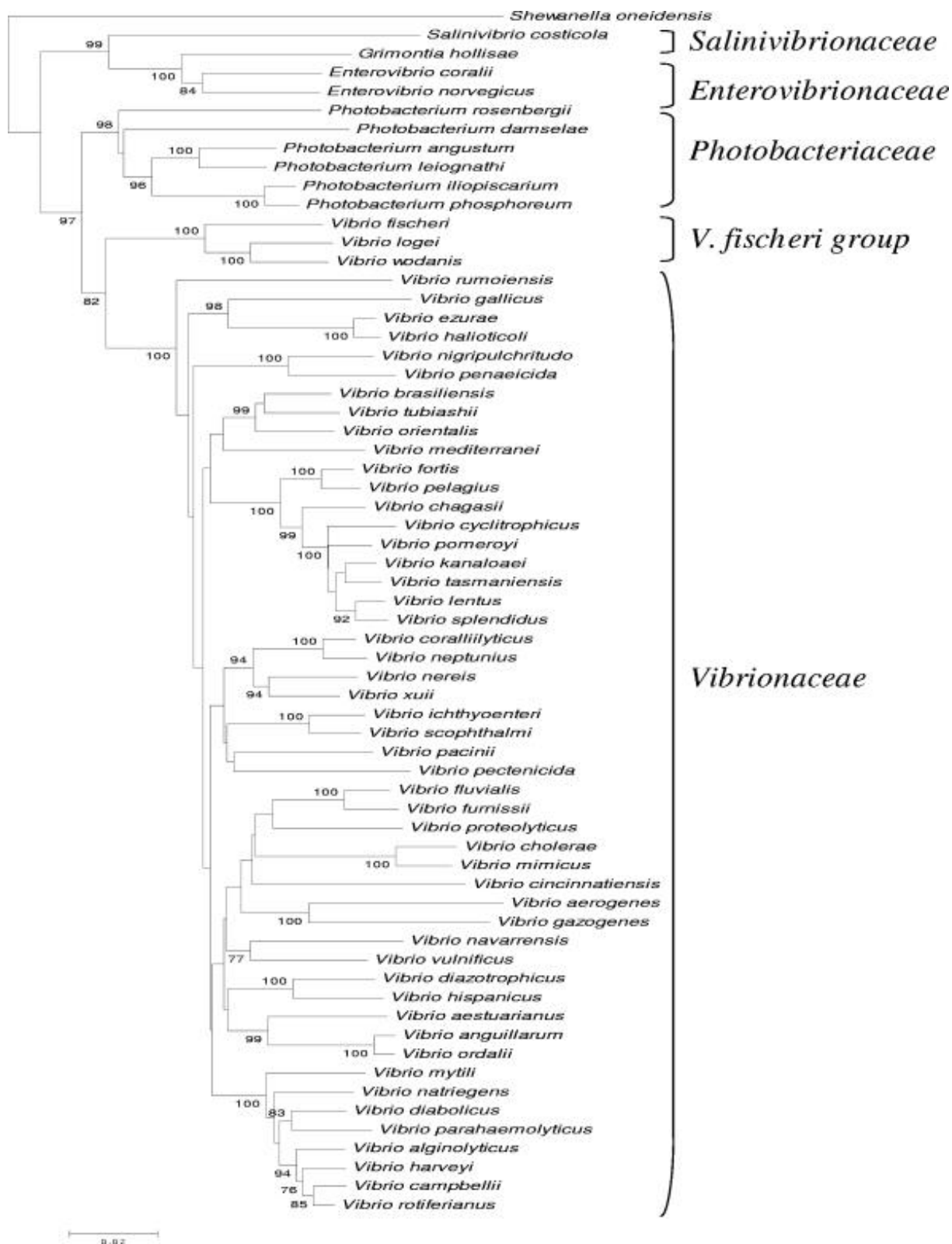
plusieurs flagelles polaires entourés d'une gaine qui est un prolongement de la membrane externe. A l'exception des espèces. *Vibrio cholerae* et *Vibriomimicus*, qui sont halotolérantes, les espèces de *Vibrio* sont halophiles et requièrent du chlorure de sodium pour leur croissance. Elles poussent abondamment en milieux peptonés simples et généralement sur le milieu "marine agar". Une gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile Salt, Sucrose agar) a été développée pour l'isolement sélectif de *Vibrio*. Certaines souches sont capables d'émettre de la lumière dites souches luminescentes. Cette luminescence se produit par un mécanisme redox aérobiose (oxydation réduction), catalysé par un type unique d'enzymes : la luciférase (Voahanginirina, 1998). Parmi les *Vibrios* luminescents : *Vibrio albensis*, *Vibrio fischeri*, *Vibriologei*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio splendidus*.

I.4.1. Ecologie :

Le genre *Vibrio* fait partie des bactéries autochtones des milieux marins, beaucoup vivent en saprophytes dans les eaux douces (Raoult, 1998), mais également commun dans les habitats aquatiques salés (eaux de nier, estuaires, intestins des animaux marins), les vases et les boues marines. Chaque espèce présente un *preferendum* thermique pour sa croissance, compris pour la majorité d'entre elles entre 10 et 40°C. Ce groupe bactérien qui, de part sa quantité et sa diversité, est un élément essentiel du fonctionnement des écosystèmes laguno-côtiers. Connu comme pathogène humain, ce groupe est aussi impliqué dans les infections des animaux marins (mollusques, crustacés, poissons) (Gay, 2004 et Leroux *et al*, 2002). Ceci résulte à la fois de la pression croissante induite par l'homme sur les zones côtières et de la plasticité génétique et phénotypique des *Vibrio* qui s'adaptent rapidement aux nouvelles conditions environnementales (Fischer-le Saux *et al*, 2002).

I.4.2. Taxonomie :

Depuis une trentaine d'années, le nombre d'espèces nouvellement décrites appartenant au genre *Vibrio* a considérablement augmenté. Ainsi en 1980 seules 20 espèces étaient décrites, contre 54 en 2002 et plus de 80 aujourd'hui (Figure 4) (Thompson *et al*, 2004a; Thompson *et al*, 2006; Thompson, *et al*, 2007). Jusqu'aux les années 80, l'identification des espèces du genre *Vibrio* était basée sur des analyses de critères phénotypiques classiques et de taxonomie numérique reposant sur l'utilisation de différents composés comme source de carbone et d'énergie, l'étude des activités enzymatiques, la tolérance au sel, la luminescence, le *preferendum* de température, les antibiogrammes et la composition en GC du génome (Alsina et Blanch, 1994). Actuellement



Figure(4) : Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences concatémérisées 16S rRNA, recA et rpoA (2,898 bp), mettant en évidence différents groupes de *Vibrio* (Thompson et al. 2004a).

I.4.3. Pouvoir pathogène des *vibrio* :

Pathogène facultatif qui fait partie de la flore microbienne normale des poissons. (*Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*). Appelée aussi peste rouge, maladie rouge ou maladie des ulcères.

Symptômes et lésions : septicémie hémorragique. Assombrissement général, ulcérations et nécroses de la peau, tuméfaction voire dégradation des reins et de la rate (coloration verdâtre), foyers de nécrose sur le foie.

Impacts : anorexie, une des principales causes de mortalité en élevage.

Transmission : essentiellement au printemps et en été. Se rencontre en eau de mer et eaux saumâtres, et plus rarement en eau douce. (Girard et Lefebvre 2001).

I.5. Généralité sur le genre *Aeromonas* :

Les bactéries de l'ordre des *Aeromonadales* sont comprises dans la classe des *Gammaproteobacteria* et contiennent une seule famille, celle des *Aeromonadaceae*, qui a comme modèle type le genre *Aeromonas*. Les 17 espèces contenues dans le genre *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif (Garrity et al, 2004). Elles sont anaérobies facultatives et peuvent inclure des espèces motiles et non-motiles autant que des espèces mésophiles et psychrophiles. Bien que cet ordre ait tout d'abord été relié aux environnements aquatiques, qu'ils soient en eau douce ou salée, et qu'il ait été régulièrement associé aux espèces animales aquatiques, certaines souches d'*Aeromonas* sont des pathogènes primaires ou opportunistes des humains et d'autres animaux aussi bien homéothermes que poïkilothermes (Boone et al, 2001).

Les espèces motiles d'*Aeromonas* peuvent également être impliquées comme agents causant des septicémies variées chez le poisson (Reith et al, 2008). *A. hydrophila* est également associé à la maladie des membres rouges (*red leg disease*) chez les batraciens et avec des infections chez les tortues et les oiseaux (Reith et al, 2008).

La température de croissance optimale d'*Aeromonas* dans la littérature en général est ciblée entre 22 et 25°C. Toutefois, il a été démontré qu'une incubation à 25°C, voire même à 22°C, peut mener à la perte de certains gènes de virulence (Daher et al, 2011; Ishiguro et al, 1981; Stuber et al, 2003).

I.5.2. Pouvoir pathogène des *Aeromonas* :

Fait partie de la flore normale du poisson, devient pathogène opportuniste lorsque les conditions environnementales ou physiologiques des organismes se détériorent.

(*Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. punctata*, *A. liquefaciens* (non spécifique)).

Symptômes et lésions: les lésions occasionnées seraient dues à la production de toxines. La nageoire anale tout d'abord, puis les pectorales et la dorsale se congestionnent (rougissement des nageoires). L'abdomen se distend, l'anus se dilate et fait saillie à l'extérieur du corps. Les organes comme le cœur, le foie et les gonades sont piquetés de foyers de nécrose. Lors de l'incision du rein et de la rate, il y a émission d'un liquide épais rougeâtre.

Impacts: responsable de graves épizooties, mortalité importante, peut survenir dans les 5 jours.

Transmission : les germes peuvent être véhiculés par l'eau, la boue, les poissons, les batraciens, les oiseaux ichtyophages, les parasites externes (*Argulus* ou *Piscicola*), mais aussi par l'homme. Maladie très contagieuse. Atteinte maximale : en milieu naturel, à 16 °C, entre mai et juillet, chez les anguilles jaunes. **Girard et Lefebvre (2001).**

I.6. Généralité sur le genre *Pseudomonas*:

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des *protéobactéries* et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (**Bossis et al, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004**). Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. (**Palleroni, 2008**).

I.6.1. Ecologie et biologie des *Pseudomonas* :

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose).

Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes possèdent tous un cytochrome oxydase c ayant un maximum d'absorption caractéristique à 552/554 nm, qui peut être mise en évidence par l'oxalate de N, N-diméthyl-paraphénylène-diamine (**Lelliot et al, 1966**). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certaines sont chimio organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables (versatilité nutritionnelle), et certaines ont la capacité de croître même dans

l'eau (Stanier *et al*, 1966). La plupart étant saprophytes (Bossis *et al*, 2000 ; Ramalho *et al*, 2002).

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer sont négatifs (Palleroni, 1984).

Ces bactéries contribuent donc, de façon significative, à la réduction des nitrates et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques (Latour et Lemanceau, 1997). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Euzeby, 2008).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exopolysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca *et al*, 2007). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanoates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

I.6.2. Taxonomie des *Pseudomonas* :

Depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre. Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet. (Anonyme 4). Comprennent les tests tels que : la forme cellulaire, le type de flagelle, l'utilisation des sources de carbones tel que : les acides organiques, les polyols, les acides aminés, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exo-enzymes et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005).

Tableau(3): Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (Euzeby, 2008 in Peix *et al*, 2009).

<i>P. abietaniphila</i> ^a	<i>P. cuatrocienegasensis</i> ^b	<i>P. mandelii</i> ^a	<i>P. pseudoalcaligenes</i> ^a
<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>P. delhiensis</i> ^b	<i>P. marginalis</i> ^a	<i>P. psychrophila</i> ^b
<i>P. agarici</i> ^a	<i>P. duriflava</i> ^b	<i>P. marincola</i> ^b	<i>P. psychrotolerans</i> ^b
<i>P. alcaligenes</i> ^a	<i>P. extremorientalis</i> ^b	<i>P. mediterranea</i> ^c	<i>P. putida</i> ^a
<i>P. alcaliphila</i> ^b	<i>P. ficuserectae</i> ^a	<i>P. meliae</i> ^a	<i>P. reinekei</i> ^b
<i>P. amygdali</i> ^a	<i>P. flavescens</i> ^a	<i>P. mendocina</i> ^a	<i>P. resinovorans</i> ^a
<i>P. anguilliseptica</i> ^a	<i>P. flectens</i> ^a	<i>P. meridiana</i> ^c	<i>P. rhizosphaerae</i> ^b
<i>P. antarctica</i> ^b	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. migulae</i> ^a	<i>P. rhodesiae</i> ^a
<i>P. argentinensis</i> ^b	<i>P. fragi</i> ^a	<i>P. mohnii</i> ^b	<i>P. sabulinigr</i> ^b
<i>P. asplenii</i> ^a	<i>P. frederiksbergensis</i> ^b	<i>P. monteilli</i> ^a	<i>P. salomonii</i> ^b
<i>P. avellanae</i> ^a	<i>P. fulva</i> ^a	<i>P. moorei</i> ^b	<i>P. savastanoi</i> ^a
<i>P. azotifigens</i> ^b	<i>P. fuscovaginae</i> ^a	<i>P. moraviensis</i> ^b	<i>P. segetis</i> ^b
<i>P. azotoformans</i> ^a	<i>P. gelidicola</i> ^c	<i>P. mosselii</i> ^b	<i>P. simiae</i> ^b
<i>P. balearica</i> ^a	<i>P. geniculata</i> ^c	<i>P. mucidolens</i> ^a	<i>P. straminea</i> ^a
<i>P. betelii</i> ^c	<i>P. gessardii</i> ^a	<i>P. multiresinivorans</i> ^a	<i>P. stutzeri</i> ^a
<i>P. borbori</i> ^b	<i>P. graminis</i> ^a	<i>P. nitroreducens</i> ^a	<i>P. synxantha</i> ^a
<i>P. boreopolis</i> ^b	<i>P. grimontii</i> ^b	<i>P. oleovorans</i> ^a	<i>P. syringae</i> ^a
<i>P. brassicacearum</i> ^b	<i>P. guineae</i> ^b	<i>P. orientalis</i> ^a	<i>P. taetrolens</i> ^a
<i>P. brenneri</i> ^b	<i>P. halophila</i> ^a	<i>P. oryzihabitans</i> ^a	<i>P. thermotolerans</i> ^b
<i>P. caeni</i> ^b	<i>P. indica</i> ^b	<i>P. otitidis</i> ^b	<i>P. thivervalensis</i> ^b
<i>P. cannabina</i> ^a	<i>P. japonica</i> ^b	<i>P. pachastrellae</i> ^b	<i>P. tolaasii</i> ^a
<i>P. caricapayae</i> ^a	<i>P. jessenii</i> ^a	<i>P. palleroniana</i> ^b	<i>P. tremae</i> ^a
<i>P. cedrella</i> ^a	<i>P. jinjuensis</i> ^b	<i>P. panacis</i> ^b	<i>P. trivialis</i> ^b
<i>P. chloritidismutans</i> ^b	<i>P. kilonensis</i> ^b	<i>P. panipatensis</i> ^b	<i>P. tuomuerensis</i> ^b
<i>P. chlororaphis</i> ^a	<i>P. knackmussii</i> ^b	<i>P. parafulva</i> ^b	<i>P. umsongensis</i> ^b
<i>P. cichorii</i> ^a	<i>P. koreensis</i> ^b	<i>P. peli</i> ^b	<i>P. vancouverensis</i> ^a
<i>P. cissicola</i> ^b	<i>P. libanensis</i> ^a	<i>P. pertucinogena</i> ^a	<i>P. veronii</i> ^a
<i>P. citronellolis</i> ^a	<i>P. lini</i> ^b	<i>P. pictorum</i> ^c	<i>P. viridiflava</i> ^a
<i>P. congelans</i> ^b	<i>P. lundensis</i> ^a	<i>P. plecoglossicida</i> ^b	<i>P. vranovensis</i> ^b
<i>P. corrugata</i> ^a	<i>P. lurida</i> ^b	<i>P. poae</i> ^b	<i>P. xanthomarina</i> ^b
<i>P. constantinii</i> ^b	<i>P. lutea</i> ^b	<i>P. pohangensis</i> ^b	<i>P. xiamenensis</i> ^b
<i>P. cremoricolorata</i> ^b	<i>P. luteola</i> ^a	<i>P. proteolytica</i> ^b	<i>P. xinjiangensis</i> ^b

a: espèces incluses dans le Bergey's Manual (**Palleroni, 2005**); b: espèces décrites après la publication du **Bergey's Manual (2005)** ; c: espèces décrites avant la publication du **Bergey's Manual (2005)** qui n'ont pas été incluses dans cette édition mais dont les noms sont validés (d'après **Euzeby, 2008 in Peix et al, 2009**).

I.6.3. Pouvoir pathogène des *Pseudomonas*:

Pseudomonas anguilliseptica et *P. fluorescens* (non spécifique). Appelée aussi peste rouge ou encore maladie des tâches rouges.

Symptômes et lésions: pathogénécité due à la libération de protéases. Lésions à caractère érythémateux, avec des hémorragies se déclarant au niveau des opercules, de la bouche et de la face ventrale du corps (tâches rougeâtres). Les reins sont dégénérés et les branchies sont pâles, avec beaucoup de mucus en surface. Les nageoires pectorales ne sont pas touchées.

Impacts: apathie et anorexie aboutissant à des mortalités importantes en périodes d'épizooties.

Transmission : directe à travers la peau. Apparaît en cas de stress (élévation, de température, surdensité). **Girard et Lefebvre (2001)**.

I.7. La maladie de saprolégniose chez les poissons :

I.7.1. Les caractéristiques de la Saprolégniose :

Les *Saprolegnia* sont des «moisissures aquatiques», ou oomycètes, faisant partie de l'ordre des *Saprolegniales*. *S. parasitica* est endémique à tous les habitats d'eau douce à travers le monde et est en partie responsable du déclin des populations naturelles de saumon et de d'autres poissons d'eau douce (Van West, 2006). En effet, il a été montré que chez la plupart des espèces de poissons d'eau douce si l'infection se répand et n'est pas traitée, elle peut entraîner 50% de mortalité dans une population donnée (Mayer, 2000). Les différentes espèces de *Saprolegnia* sont capables de germer sous différentes conditions environnementales et de nutriments (Willoughby, 1985). Ils peuvent tolérer une large étendue de températures allant de 3 à 33°C, ce qui reflète les préférences thermiques pour l'hôte (Pickering et Willoughby, 1982). Le genre *Saprolegnia* est considéré comme un pathogène opportuniste qui est saprophyte et nécrophage (Van West, 2006). La croissance du fungi se présente sous une apparence duveteuse, en forme de touffes cotonneuses composées de filaments plus ou moins ramifiées (mycélium). Sa couleur varie du blanc à gris blanc ou gris-marron. Il apparaît sur la peau, les nageoires, les branchies ou les yeux des poissons. C'est à partir de ces caractéristiques, il est possible de conclure à un diagnostic positif de la saprolégnirose (Howe et Stehly, 1998). La maladie progresse rapidement et conduit rapidement à la mort (Howe et Stehly, 1998). Les connaissances sur les espèces de *Saprolegnia*, leur pathogénie et le contrôle des infections restent encore mal connues. Les facteurs sous-jacents responsables de la maladie ne sont pas encore clairement établis (Van West, 2006).

I.7.2. Classification des espèces de *Saprolegnia* :

Les espèces *Saprolegnia* possèdent des caractères communs avec les moisissures et les algues (Stueland *et al*, 2005). *Saprolegnia* fait partie du phylum des oomycètes, un groupe de protistes filamenteux d'environ 500 espèces (figure 5) (Bruno et Wood, 1999). En effet, ces derniers possèdent d'importantes ramifications de mycéliums non-cloisonnés (Branson, 2002).

Il existe différentes souches de *S. parasitica* et certaines sont plus virulentes que d'autres (Howe et Stehly, 1998). La libération des zoospores primaires, un à la fois, se fait par le pore apical du zoosporange. Il s'agit du principal caractère permettant la séparation de *Saprolegnia* des autres genres (Stueland *et al*, 2005). De plus, le mode de germination indirect des zoospores est selon Hatai et Hoshiai (1992b) et Yussa *et al*. (1997), une caractéristique de *S. parasitica* (Hussein *et al*, 2001).

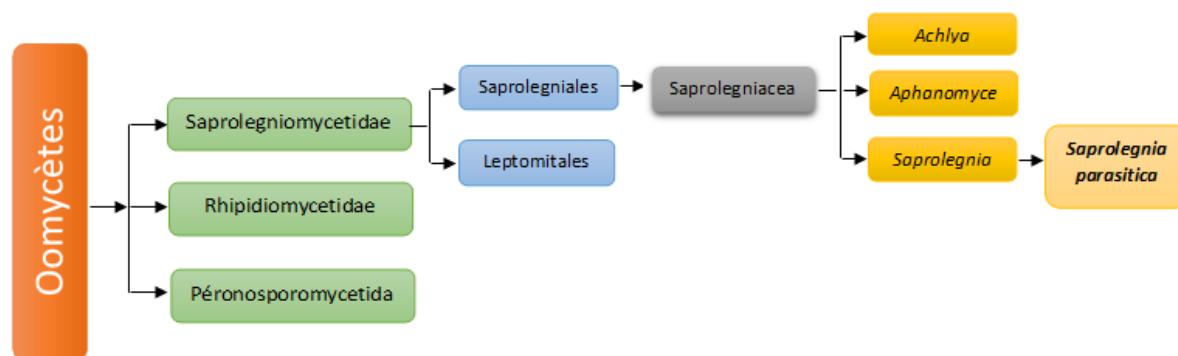


Figure (5): Arbre phylogénétique de *Saprolegnia parasitica* (Jessica Seenevaragachetty, 2001).

I.7.3. Mode d'infection :

Les poissons deviennent plus vulnérables à *Saprolegnia* lorsqu'ils sont exposés à des conditions de stress telles que des blessures lors des manipulations, des régimes alimentaires inadéquats, une mauvaise qualité de l'eau, une trop faible circulation dans les infrastructures d'incubation, une température élevée, une faible concentration en oxygène, des densités élevées de poissons, lors de la fraie, des substances toxiques qui provoquent un stress chez l'animal, le parasitisme externe et la présence d'une maladie primaire d'origine bactérienne ou virale (Gieseke *et al*, 2006 ; Meyer, 1991).

➤ Sur les œufs du poisson :

Tout d'abord, *Saprolegnia* va infecter les œufs des poissons morts car ils constituent un substrat fertile pour les croissances fongiques. Puis, elle va s'attaquer aux œufs des poissons sains. À l'intérieur des œufs, il y a une importante croissance de mycéliums sur les cellules, ce qui va entraîner leur mort par étouffement (Van West, 2006). Si la croissance fongique n'est pas retiré physiquement ou par des traitements chimiques, des lots entiers d'œufs seront perdus (Meyer, 1991).

Smith *et al.* (1985) ont observé que l'infection des œufs vivants se faisait par contact avec les hyphes seulement et non par les spores.

➤ Chez les alevins :

Chez les alevins qui commencent à s'alimenter, elle est capable d'infecter le tube digestif, la vésicule vitelline tout comme la peau, les branchies et les nageoires de l'animal (Mayer, 2000; Pickering et Willoughby, 1982). Ils présentent alors un gonflement de la vésicule vitelline ou de l'abdomen (Van West, 2006).

➤ **Chez le Poissons :**

La maladie peut infecter les blessures causées lors de la manipulation des poissons lors de leur transfert (Mayer, 2000). L'infection commence au niveau de la peau, ce qui cause une tache blanche qui a l'aspect de «touffe de coton» sous l'eau à cause des hyphes du fongique (Branson, 2002) (figure...). Elle s'attaque ainsi aux tissus épidermiques au niveau de la tête et des nageoires jusqu'à envahir toutes les surfaces du corps (Van West, 2006). Elle infecte aussi les branchies des poissons. La maladie provoque des plaques blanchâtres ou grisâtres sur la peau du poisson et sur ses branchies. Elle atteint une partie du corps du poisson. Puis, elle atteint l'épiderme et le derme et détruit ainsi les tissus au fur et à mesure qu'elle se propage (Pickering et Willoughby, 1982).

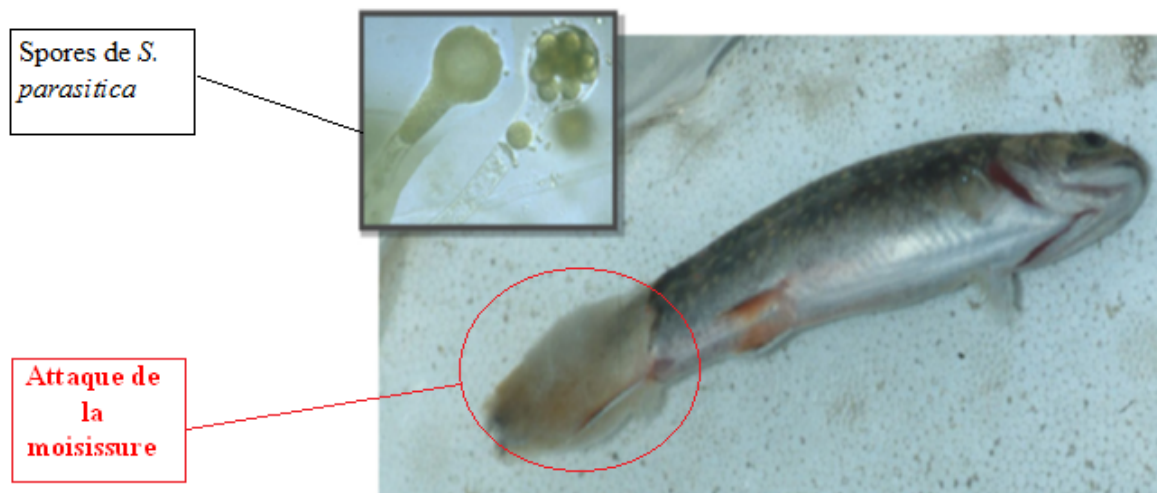


Figure (6) : Poisson infecté (Aquicole Octobre 2005).

Chapitre deuxième

Matériel et méthodes

Aller à l'idéal, mais comprendre le réel

Jean Jaurès

II.1. Cadre d'étude :

Cette étude s'est déroulée du 3 septembre au 3 octobre 2013 au niveau du laboratoire de microbiologie (LBCM1) de l'ENSSMAL.

II.2. Matériel biologique :

Cinq poissons rouges : deux poissons rouges communs, deux poissons rouges à têtes de lion et un poisson rouge à tête de buffle.

II.2.1. Site de prélèvement :

Les poissons ont été achetés au niveau d'une animalerie située à Dely Brahim.

II.2.2. échantillonnage :

Cinq poissons rouges (deux poissons rouges communs, deux poissons rouges à têtes de lion et un poisson rouge à tête de buffle) ont été prélevés à partir d'un aquarium par un vendeur de l'animalerie et mis séparément dans des sacs dont $\frac{1}{3}$ du volume est rempli d'eau de l'aquarium de prise (à raison de deux individus par sac). Les poissons ont été transportés dans une glacière jusqu'aux aquariums de la serre de l'ENSSMAL.

II.2.3. Aspect général externe des poissons :

Les poissons achetés présentaient :

- Une pigmentation (coloration) normale.
- Absence de lésions cutanées.
- Absence d'hémorragies.
- Absence d'érosions ou signes corrosifs.
- Prise d'aliment normale et absence de signes anorexiques.
- Nage harmonieuse et ordonnée et absence de signes irritatifs.
- Gonflement abdominal plus ou moins important.
- Organes externes sains (nageoires, yeux, opercules).
- Absence de signes nécrotiques.

- Activité respiratoire sainte
- Pour le poisson rouge à tête de buffle on a signalé :
 - Un important gonflement abdominal
 - Une nage désordonnée et pipetage de l'air à la surface de l'eau de l'aquarium ; signe de détresse respiratoire.

II.2.4. Préparation de l'échantillon :

Après 48 heures de mise en captivité des poissons dans deux aquariums de la serre, ces derniers furent transportés au moyen de sac dont $\frac{1}{3}$ du volume est rempli d'eau de l'aquarium vers le laboratoire de microbiologie de l'ENSSMAL.

Pendant la captivité il n'y a eu aucune évolution de leur état, les poissons présentaient les mêmes signes signalés ci-dessus, pendant cette période les poissons ont été alimentés deux fois par jour par un aliment artificiel marque en granulés.

Au niveau du laboratoire de microbiologie la taille totale des poissons est mesurée au moyen d'un ichtyomètre et le poids des poissons est mesuré au moyen d'une balance de précision (voir résultats..).

II.2.4.1. Préparation des milieux de culture :

Nous avons préparé les milieux de culture pour mettre en évidence la présence des genres (*Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*) et la flore fongique, responsables de nombreuses infections chez les poissons.

Les milieux de culture correspondant aux genres ; *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* et la flore fongique sont respectivement ; la gélose Columbia au sang, le milieu TCBS (Thiosulfate citrate, bile, saccharose), les milieux dits King A et King B et le milieu Sabouraud.

Le choix de ces genres est dicté par la disponibilité des milieux de culture au sein du laboratoire de microbiologie de l'ENSSMAL.

La préparation des milieux de culture (la gélose columbia ; gélose thiosulfate au citrate, à la bile, au saccharose, Hektoen, Muller Hinton, ont été préparés selon les recommandations de Merck. Alors que la gélose Sabouraud a été élaborée selon les instructions de Fluka. La composition des différents milieux figure dans les annexes.

II.2.4.2. Prélèvement bactériologique :

Le traitement des poissons et les prélèvements ont été effectués en respectant toutes les règles d'hygiène et d'asepsie. Tout le matériel ayant servi à la préparation et à la dissection des poissons a été stérilisé à l'étuve à 170° C pendant une heure.

Pour chaque poisson nous avons procédé à 3 prélèvements différents :

Le premier a consisté à passer l'écouvillon sur toute la surface de la peau. Alors que le second a consisté à écouvillonner l'abdomen après dissection du poisson en respectant toutes les règles d'hygiène et d'asepsie.

Le 3^{ème} prélèvement a été réalisé au niveau des branchies. En premier lieu, nous avons écouvillonné les branchies, ensuite à l'aide de ciseaux stériles nous avons coupé les opercules. Puis nous avons prélevé les branchies au moyen de pinces stériles. A la fin nous les avons déposés à la surface des boîtes de Pétri.

L'observation à l'œil nu des branchies révèle une coloration rouge pourpre, l'absence de syndrome anémique, d'hémorragies, de lésions nécrotiques (pourriture des branchies). L'observation de la masse viscérale révèle des organes internes sains, l'absence d'hémorragies, de signes inflammatoires et de kystes.

II.2.4.3. Mises en culture des germes :

Les ensemencements concernant la peau, la surface des branchies et l'intérieur de l'abdomen ont été réalisés par écouvillonnage des surfaces des géloses. Alors que les branchies ont été directement déposées à la surface des différents milieux de culture.

Les 30 boîtes par échantillons sont ensemencées, placées en position renversée pour éviter la condensation de l'eau sur le couvercle, puis incubées aux températures appropriées.

II.2.4.4. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa***II.2.4.4.1. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* sur les milieux King A et B****Mode opératoire :**

La recherche de *P. aeruginosa* s'effectue par dépôt des branchies et par ensemencement (écouvillonnage) en surface des milieux king A puis King B. Ce milieu permet une identification rapide de cette espèce. **Pérez et al, 1989.**

L'incubation : se fait à 37° C et à température ambiante (25° C) pendant 48h.

La gélose King A

Principe :

La gélose King A permet la production de pyocyanine, pigment bleu sous lumière UV laquelle est due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*. Elle est favorisée par la présence d'ions inorganiques dans le milieu

La gélose King B

Principe :

La gélose King B permet la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune vert fluorescent sous lumière ultra-violette, par certains *Pseudomonas*. La production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. *Pseudomonas aeruginosa* produit ce pigment fluorescent contrairement à certaines espèces de *Pseudomonas* qui n'en produisent pas.

Lecture :

Les colonies de *P. aeruginosa* (commun aussi aux espèces du groupe *P.fluorescens*) sont plates, à bord irrégulier et prenant un aspect irisé métallique avec le temps, elles présentent une pigmentation caractéristique bleue ou bleu-vert et une fluorescence sous ultra-violet à 254 nm. La lecture a été réalisée grâce à une table UV.

II.2.4.5. Recherche des *Vibrio* :

La gélose au Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) constitue un milieu sélectif destiné à l'isolement de *Vibrio cholerae* et des autres vibrions entéropathogènes (en particulier *Vibrio parahaemolyticus*) dans les poissons, les produits de la mer et les autres prélèvements biologiques d'origine animale (**Anonyme5**).

Principe :

Les concentrations élevées en thiosulfate et en citrate de sodium ainsi que la forte alcalinité du milieu inhibent fortement la croissance des entérobactéries.

- La bile de bœuf et le cholate de sodium ralentissent la culture des entérocoques et inhibent le développement des germes à Gram positif.
- Par acidification du milieu, résultant de la fermentation du saccharose, les *Vibrio* provoquent le virage au jaune de l'indicateur au thymol et au bleu de bromothymol.
- A partir du thiosulfate, qui constitue une source de soufre, la production de sulfure d'hydrogène est révélée en présence de citrate ferrique. Tous les *Vibrio* sont H₂S-négatifs.

Lecture :

Les colonies présentent les aspects suivants :	Microorganismes
Colonies jaunes, planes, de 2 à 3 mm de diamètre :	<i>Vibrio cholerae</i> .
Colonies jaunes, de grande taille :	<i>Vibrio alginolyticus</i> .
Colonies jaunes ou translucides :	<i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> .
Colonies incolores à centre vert :	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
Colonies bleues :	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> .
Colonies minuscules, transparentes :	<i>Entérobactériacées ou autres</i> .

Des tests complémentaires doivent être effectués pour l'orientation de l'identification des colonies douteuses.

II.2.4.6. Recherche d'*Aeromonas***II.2.4.6.1. Recherche d'*Aeromonas* sur la gélose Columbia au sang :****Principe :**

La recherche d'*Aeromonas* a été effectuée sur la gélose Columbia au sang (addition de 5% de sang humain frais). Les boîtes de Pétri sont incubées à température ambiante et à 37°C pendant 24-48h.

Lecture :

Aeromonas donnent des Colonies grisâtres, β -hémolytiques sur gélose Columbia au sang). La β -hémolyse se traduit par une zone claire facilement visible entourant les colonies. Cet éclaircissement est dû à la capacité des bactéries à détruire complètement les globules rouges (Anonyme X, 1987).

II.2.4.7. Recherche de la flore fongique :**Recherche et dénombrement de la flore fongique :**

Le milieu Sabouraud additionnée d'amoxiline a été utilisé pour la recherche des levures et moisissures. L'amoxiline est ajoutée au milieu (0.1g/l) en vue d'inhiber la croissance bactérienne. Les Boîtes de Pétri sont incubés à température ambiante pendant une semaine.

II.2.5. Isolement et purification des souches :

Pour toutes les cultures sur les différents milieux La coloration de Gram, le test de catalase et celui de l'oxydase ont été réalisés sur les colonies suspectes. La pureté des souches a été vérifiée par observation microscopique après une coloration de Gram. Les souches pures de *vibrio* sont obtenues par plusieurs repiquages consécutifs. Malheureusement, la forte production de biofilms synthétisés par *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas* présumés n'a pas permis la sélection de colonies bien isolées sur les géloses King A et B et Columbia au sang. Cinq repiquages successifs n'ont pas abouti à l'isolement de colonies bien distinctes.

Dans le but d'améliorer l'isolement des souches nous les avons repiquées après une dilution dans de l'eau peptonée. Puis nous avons tenté de ré-isoler par la technique des quadrants. Nous avons également additionné de l'acide salicylique aux cultures sur bouillon de *Pseudomonas* en vue de désintégrer le biofilm et bien séparer les colonies.

II.2.5.1. Essai de l'obtention de souches pures :

- Ensemencement en stries par épuisement sur les quatre quadrants :

Avant l'utilisation des boîtes de Petri, on a procédé à la division de ces dernières en 4 quarts

A l'aide d'une anse préalablement flambée, prélever un fragment de chaque colonie. L'inoculum est déposé en un point périphérique de la surface du milieu puis il est étalé en stries serrées sur une moitié de la boîte de Pétri (quadrants 1 et 2). La boîte est pivotée d'un quart de tour. L'anse est flambée sert à faire des stries serrées en partant du 2^{ème} vers le 3^{ème}. Après avoir stérilisé à nouveau la pipette Pasteur, on fait tourner la boîte d'un quart de tour on répète l'opération en disséminant l'inoculum du 3^{ème} quadrant vers le 4^{ème}.

Les boîtes ensemencées sont placées en position renversée pour éviter la condensation de l'eau sur le couvercle puis incubées à la température adéquate.

- Ensemencement en stries par épuisement après dilution :

Le choix du diluant est fonction du germe recherché. Pour les *vibrio* de l'eau peptonée alcaline salé a servi de diluant. Alors que les *Pseudomons* et les *Aeromonas* sont dilués dans de l'eau peptonée tamponnée.

Une parcelle d'une colonie suspecte est diluée dans 10 ml de Diluant puis vortexer. L'agitation au vortex a pour but de mettre en suspension la colonie prélevée et bien disperser les germes.

Une goutte de la suspension bactérienne est prélevée puis ensemencée en stries par la technique des quatre quadrants sur le milieu approprié.

II.2.6. Tests de caractérisation :

L'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas* présumés n'a pas permis la sélection de colonies bien isolées sur les géloses King A et B et Columbia au sang. Cinq repiquages successifs ont été réalisés. Des tests complémentaires ont été réalisés

Les boîtes de gélose Columbia sont incubées à 37°C celles de King A et B sont incubés à température ambiante et à 41°C.

II.2.6.1. Tests complémentaires pour la caractérisation de *Pseudomonas aeruginosa* :

Les tests suivants ont été effectués en vue de confirmer la présence de *Pseudomonas aeruginosa* :

- La coloration de Gram,
- la recherche de la catalase et de l'oxydase
- La production des deux pigments (la fluorescéine et la pyocyanine) sur les milieux King,
- la croissance à 41-42 °C,
- l'aérobiose stricte,
- la croissance sur le milieu Muller Hinton avec production de fluorescéine

Pour améliorer l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* toutes les boîtes sont incubées à 41°C et de l'acide salicylique a été additionné au diluant. Cet ajout est destiné à désintégrer le biofilm et d'obtenir des colonies bien isolées. Après incubation et apparition du trouble, une goutte de la suspension bactérienne est prélevée puis ensemencée en stries par la technique des quatre quadrants sur chaque milieu.

II.2.6.2. Test d'anaérobiose pour le genre *pseudomonas* :

Principe : Les bactéries du genre *pseudomonas* sont aérobies strictes, on a essayé par ce test de prévoir l'absence de culture pure du genre *pseudomonas sp* dans des milieux anaérobies.

Mode opératoire :

- Des tubes de King A et King B sont ensemencés, on verse de l'huile de paraffine à la surface ce qui va former une épaisse couche.
- Incuber les tubes King A et King B à 41°C pendant 24 heures

N.B : la couche formée par l'huile de paraffine à la surface du tube ne permet pas le passage des molécules d'oxygène au fond du tube.

II.2.6.3. Tests complémentaires pour la recherche d'*Aeromonas* (Clave, 2010) :

Les tests suivants sont utilisés pour confirmer ou infirmer la présence d'*Aeromonas* :

- Croissance sur milieu S-S : ce milieu est inhibiteur des bactéries du genre *Aeromonas*.
- Croissance sur PCA hypersalé (6,5%) de Na Cl : Absence de croissance sur ce milieu.
- Croissance sur Hektoen: les colonies sont jaunes car elles fermentent le saccharose.

L'ensemencement sur ces géloses est fait par stries. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

- Vérification du caractère psychrophile des colonies : le test est réalisé par un ensemencement en spot et l'incubation s'est faite au réfrigérateur à 10°C pendant 2 semaines.

Les milieux S-S, PCA hypersalé (6,5%) de NaCl, Hektoen ont servi la confirmation ou l'infirmer des *Aeromonas*. L'ensemencement sur ces géloses s'est fait par stries *Aeromonas* (technique des quadrants).

II.2.7. Techniques d'identification bactérienne :**II.2.7.1. Technique de coloration de Gram :**

- **préparation du frottis :** mettre une goutte d'eau distillée stérile sur une lame propre, prélever un fragment d'une colonie bactérienne isolée et procéder à l'étalement sur la lame
 - sécher la lame sur une plaque chauffante
- **Fixation :**
 - tenir la lame avec une pince en bois et la passer trois fois à la flamme avec la lame. Cette démarche consiste à neutraliser les bactéries, à rendre les membranes plus perméables, à fixer les structures sans les altérer et contribuer à l'adhésion du frottis sur la lame.

➤ Coloration de Gram :

- **coloration primaire** : couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir pendant 2 minutes puis jeter l'excès de colorant.
- **Mordantage** : égoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun durera 45 secondes.
- **Décoloration** : égoutter et plonger la lame dans de l'alcool 96° durant 30 secondes.
- **Coloration secondaire** : procéder à une recoloration de la lame avec de la fuchsine pendant deux minutes.
- laver à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme

➤ Observation au microscope :

- après fixation de la lame, observer à l'objectif à immersion (G 100*10), on a :
 - les bactéries colorées en violet sont les bactéries dites à Gram +
 - les bactéries colorées en rose sont les bactéries dites Gram –

II.2.7.2. Recherche de la réaction de l'oxydase :

- L'oxydase ou le cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes (**Dellaras, 2007**).
- La recherche de la réaction de l'oxydase consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacée (**Prescott *et al*, 2010**).

➤ Mode opératoire :

- Déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque «Ox» et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile ou de l'eau physiologique stérile.
- Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une anse préalablement flambée et l'étaler sur le disque.

- Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir indique que la bactérie produit une oxydase (**Dellaras, 2007**).

II.2.7.3. Recherche de la catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives (**Dellaras, 2007**). Cette enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit par certaines réactions cellulaires et très toxiques, donc c'est l'une des enzymes chargée d'éponger l'eau oxygénée par la dismutation (PELMONT, 1993). La réaction catalysée est la suivante :



➤ Mode opératoire :

- sur une lame propre, séchée, on dépose une goutte d'eau oxygénée.
- à l'aide d'une anse préalablement flambée, on dépose un fragment d'une colonie bien isolée sur la goutte.
- l'observation est immédiate :
 - Catalase(+) : apparition de bulles due aux dégagements gazeux de dioxygène.
 - Catalase(-) : absence d'effervescence ou de bulles

N.B : la coloration de Gram, le test de la catalase et celui de l'oxydase ont été réalisés sur les colonies bactériennes suspectes. La pureté des souches a été vérifiée ultérieurement par l'observation microscopique après coloration de Gram. Les souches pures sont obtenues par plusieurs repiquages consécutifs.

Chapitre Troisième
Résultats et discussions

III.1. Résultats et discussion de la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* :

Après ensemencement sur milieux **King A et King B** des différents échantillons prélevés au niveau des sites (peau, branchies, viscères), les colonies qui poussaient sur les milieux gélosés (à température ambiante et incubation à 37°C), avaient les propriétés suivantes :

- Coloration : beige, crémeuse et rosâtre.
- Consistance : gluante
- Contour : plus au moins régulier
- Bords : lisses ou plats brillants
- Fluorescence du milieu : ceci est dû à la production de pigments (pyoverdine et pyocyanine) par les souches ceci sera confirmé après la lecture sous UV.
 - La fluorescence du milieu était très importante pour les milieux **King A et King B** ensemencés, laissés à température ambiante.
 - Certaines colonies avaient l'aspect confluent, à coloration crémeuse-brunâtre à substance mucoïde probablement due à une forte production de biofilm.
 - Les repiquages successifs sur milieux **King A et King B** n'ont pas permis un éventuel isolement des souches pures de *Pseudomonas aeruginosa*, on a opté dans cette étape autres techniques afin d'obtenir des cultures pures pour y travailler dessus.



Figure (7) : Observation macroscopique des souches de *Pseudomonas* qui poussent sur les milieux King A et King B.

III.1.1. Résultats et discussion du test de fluorescence sous UV :

La lecture sous UV des boîtes ensemencées a révélé :

- Les colonies qui poussaient sur milieu **King A** produisent le pigment pyocyanine (fluorescence bleue du milieu), caractérisant la présence de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.
- Les colonies qui poussaient sur milieu **King B** produisent le pigment pyoverdine (fluorescence verte du milieu), caractérisant la présence de la souche *pseudomonas aeruginosa* commun aussi à *Pseudomonas fluorescens*.

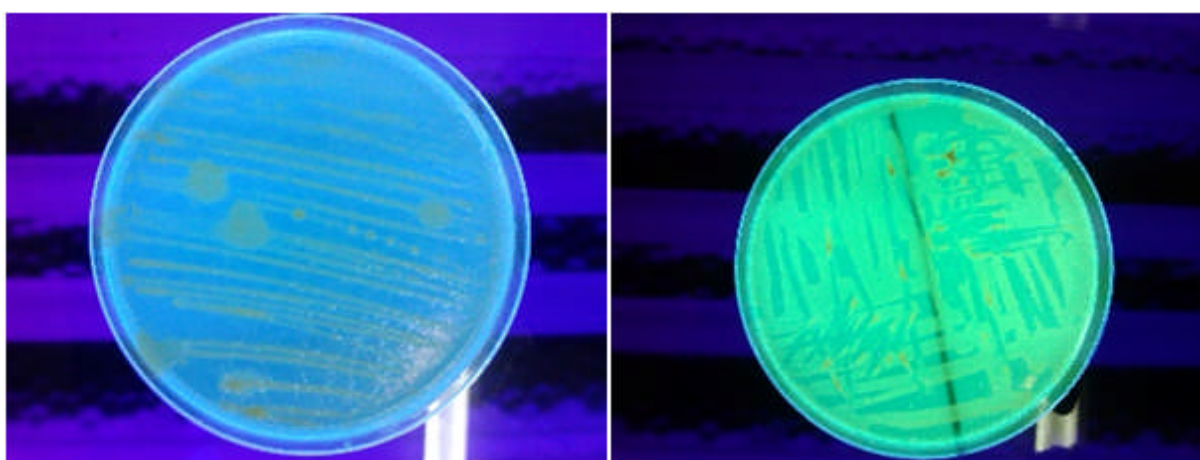


Figure (8) : Observation de la fluorescence à l'UV sur King A et King B.

III.1.2. Résultats et discussion de l'incubation des boîtes à 41°C :

L'incubation des boîtes à 41°C a révélé :

- Croissance bactérienne ayant les propriétés des colonies de *Pseudomonas aeruginosa*.
- L'incubation à 41°C a mis en évidence la présence du germe *Pseudomonas aeruginosa* (*uniquement* cette bactérie) pousse à cette température mais n'a pas permis l'obtention de culture pure ou colonies isolée ce qui confirme la présence d'autres germes que le genre *Pseudomonas*.

III.1.3. Résultats et discussion du test d'anaérobiose des tubes King A et King B :

Les résultats obtenus sont :

- Trouble apparent dans les tubes.
- Croissance bactérienne et formation de biofilm.

- Production de gaz (fermentation), fissure et décollement de la gélose (photo 9)

La croissance bactérienne signalée dans les tubes confirme la présence de germes anaérobies strictes ou aéro-anaérobies facultatifs, des bactéries fermentatives alors que les souches du genre *Pseudomonas* sont aérobies strictes et se caractérisant par un métabolisme oxydatif, ce résultat est la preuve d'une contamination des souches par des bactéries pouvant vivre en absence d'oxygène.

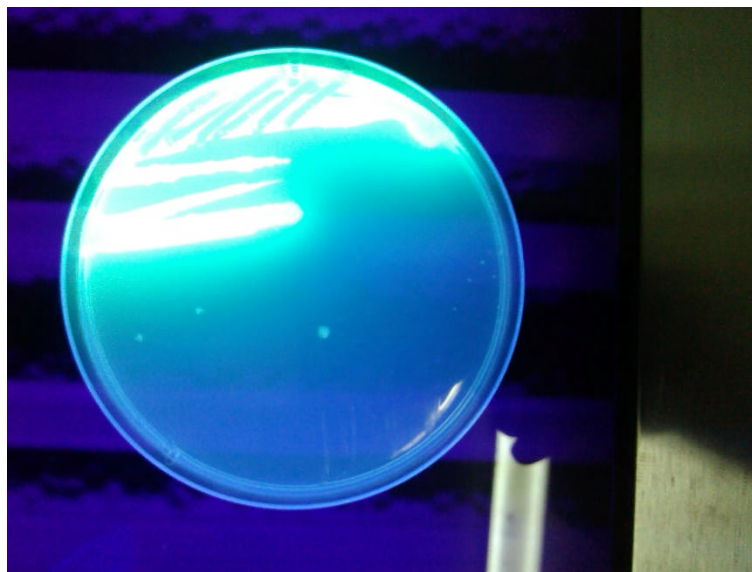


Figure(9) : Observation des tubes de test d'anaérobiose sur King A et King B.

III.1.4. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu Muller-Hinton :

Les résultats de L'ensemencement sur milieu **Muller-Hinton** et après incubation à 41°C sont :

- Croissance bactérienne à 41°C, on présume la présence du germe du genre *Pseudomonas aeruginosa*.
- Fluorescence du milieu due à la production du pigment vert ; pyoverdine confirmé après la lecture sous UV caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa*.
- La croissance sur ce milieu à une température de 41°C avec production de pigment fluorescent confirme la présence de *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure(10) : Observation des souches sous UV qui poussent sur le milieu Muller-Hinton.

III.1.5. Résultats et discussion des réactions oxydase et catalase des souches :

Concernant les tests de l'oxydase et catalase, qui sont positifs (+) pour les deux (**Palleroni, 2008 ; Bossis *et al*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004**) :

Le test de catalase est positif à cause de la prédominance de *Pseudomonas*.

La confrontation de ces résultats à la littérature indique que les souches testées sont contaminées. Ces résultats ne sont pas surprenant compte tenu de l'impossibilité de l'isolement de souches bien distinctes caractéristiques du genre.

- Les colonies étaient très confluentes, gluantes ceci est probablement dû à une forte production de biofilm. ce dernier n'a pas pu être désintégré par agitation (vortex) et ajout de l'acide salicylique.

III.1.5. Résultats et discussion de la coloration Gram :

L'observation microscopique des souches révèle :

- La présence des bacilles a G(-) dans 67% des boîtes cultivées : qu'il prouve probablement l'existence des *Pseudomonas*.
- La présence de Coccies G(+) et G(-), aussi la présence des Bacilles G(+) et coccobacilles G(+) et G(-) : qui prouve l'impureté des souches.

➤ La présence des levures.

Tableau (4) : Résultat des tests de l'oxydase et catalase et observation microscopique des souches du genre *Pseudomonas* sur les milieux King A et King B.

Echantillons	Catalase	Observation microscopique de coloration de Gram
KA P ₁	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-), Coccobacilles G(-)
KA P ₂	+	Coccies G(+), Bacilles G(-) et G(+)
KA P ₃	+	Levures, Bacilles G(-), Coccobacilles G(+)
KA P ₄	+	Bacilles G(-) et G(+), cocci G(-) plus que G(+)
KA P ₅	+	Streptobacilles en chainettes, Levures, Cocci G(-), Bacilles G(-).
KA B ₁	+	Levures, Cocci G(+) et G(-), Bacilles G(-)
KA B ₂	+	Bacilles G(-), Coccobacilles G(-), Coccies G(-)
KA B ₃	+	Coccies G(+) et G(-)
KA B ₄	+	Levures, Bacilles G(-), Coccobacilles G(+)
KA B ₅	+	Coccies G(-) et plus que G(+)
KA V ₁	+	Coccies G(+) et G(-), Levures, Coccobacilles G(-), Coccobacilles G(+),
KA V ₂	+	Coccies G(+) et G(-), Levures
KA V ₃	+	Coccies G(-), Levures, Bacilles G(-)
KA V ₄	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-)
KA V ₅	+	Coccies G(-) et G(+)
KB P ₁	+	Coccies G(-), Levures, Bacilles G(-)
KB P ₂	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-)

KB P ₃	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-), Streptocoque G(+)
KB P ₄	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-), Coccobacilles G(+)
KB P ₅	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-)
KB B ₁	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-)
KB B ₂	+	Coccobacilles G(+), Coccies G(-) et G(+), Bacilles G(+)
KB B ₃	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-), Streptocoque G(-)
KB B ₄	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(-)
KB B ₅	+	Coccies G(-), Levures, Bacilles G(-), Coccobacilles G(+)
KB V ₁	+	Coccies G(-), Bacilles G(-), Coccobacilles G(+)
KB V ₂	+	Coccies G(+), Levures, Bacilles G(-)
KB V ₃	+	Coccies G(-) et G(+), Levures, Bacilles G(+)
KB V ₄	+	Levures
KB V ₅	+	Coccies G(-), Bacilles G(-), Coccobacilles G(+)

P : peau , b : branchies , v : viscères.

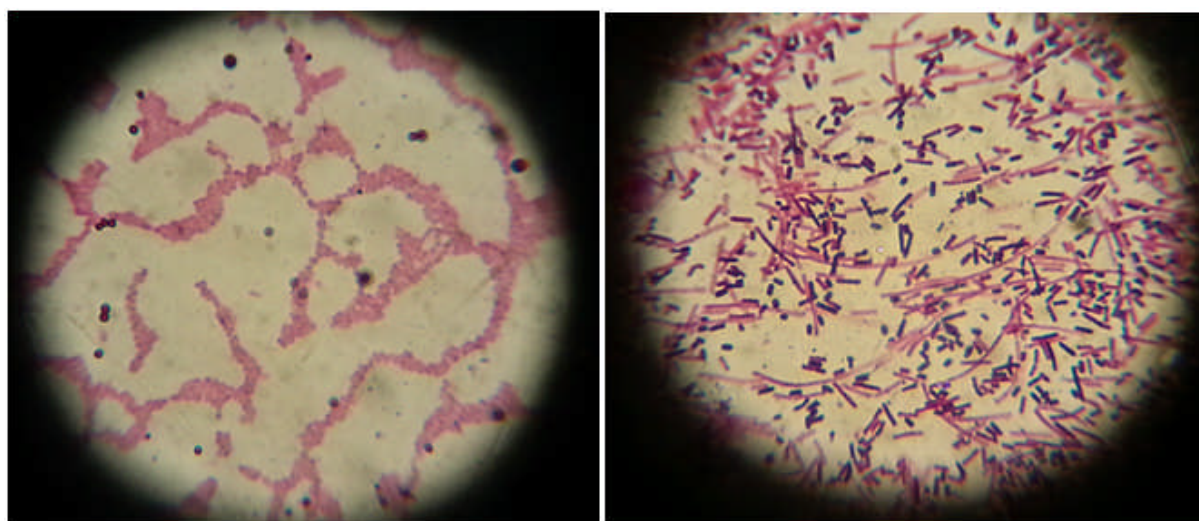


Figure (11) : Coloration de Gram des colonies sur milieu King A et King B Gx100.

III.2. Résultats et discussion de la recherche du genre *Vibrio* :

L'ensemencement sur milieu **TCBS** des différents échantillons prélevés au niveau des sites (peau, branchies, viscères), les colonies qui poussaient sur milieux gélosés (à température ambiante et à 37°C), avaient les propriétés suivantes :

- Coloration : jaune ou incolores à centre vert
- Virage de la couleur du milieu du vert vers le jaune
- Les colonies incolores à centre vert sont caractéristiques de *Vibrio parahaemolyticus* (*B-hymolitique*).
- Les colonies à coloration jaune sont caractéristiques de *Vibrio cholerae*.
- Le virage de la couleur du milieu du vert vers le jaune est causé par un changement de couleur de l'indicateur du PH du milieu, une acidification due à la fermentation du saccharose, propriété propre aux souches du genre *Vibrio*.

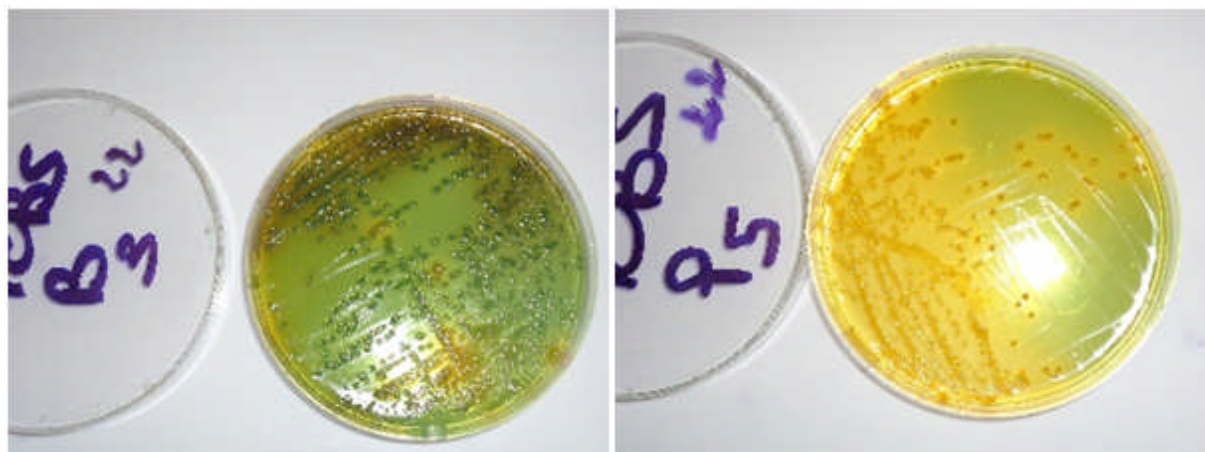


Figure (12) : Observation macroscopique des souches de *vibrio* qui poussent sur milieu TCBS.

III.2.1. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu Hektoen :

Les colonies qui poussaient sur milieu **Hektoen** étaient :

- Coloration verte ou noire
- Sur milieu **Hektoen**, les souches du genre *Vibrio* devraient être de coloration jaune, l'absence du germe recherché nous a poussés à opter d'autres tests plus distinctifs.

III.2.2. Résultats et discussion des réactions d'oxydase et catalase :

Concernant les tests de l'oxydase et catalase ils sont variables selon les souches (tableau 5)

Selon la littérature (Voahanginirina, 1998 ; Prescott et al, 2002). Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, oxydase (+) et catalase (+).

Nos résultats indiquent que les souches ne sont pas pures.

III.2.3. Résultats et discussion de la coloration de Gram :

L'observation microscopique des souches montre :

- Abondance de bacille G(-) incurvés ou droits. Les bacilles incurvés qui caractérise les *vibrio*.
- Abondance des cocci G(+) : qui indique impureté des souches.
- Présence en quantité importante de Levure.

Tableau (5) : Résultat de test de l'oxydase et catalase et observation des souches de *Vibrio* présumé en microscope photonique.

TCBS	Catalase	Oxydase	Observation microscopique de coloration de Gram
P1 (colonie incolore a centre vert)	-	-	Coccies G(+), Levures
P3 (colonie incolore a centre vert)	-	-	Coccies G(+)
P5 (colonie incolore a centre vert)	-	-	Levures, Coccies G(+), Bacilles G(-) incurvés
P1 (colonie jaune)	-	-	Coccies G(+), Bacilles G(-) incurvés
P5 (colonie jaune)	-	-	Coccies G(+), Bacilles G(-)
B3 (colonie incolore a centre vert)	+	-	Levures, Coccies G(-), Bacilles G(-)
B4 (colonie incolore a centre vert)	+	+	Coccies G(+), Bacilles G(-)

B5 (colonie incolore a centre vert)			Levures, Coccies G(+), Bacilles G(-) incurvés et droits
B3 (colonie jaune)	+		Levures, Coccies G(+), Bacilles G(-) incurvés mince, et majorité droits
B4 (colonie jaune)	+	+	Coccies G(+), Bacilles G(-)
B5 (colonie jaune)			Coccies G(+), G(-)
V1 (colonie incolore a centre vert)	-	-	Levures, Coccies G(-),
V3 (colonie incolore a centre vert)	-	-	Levures, Coccies G(+), Bacilles G(-)
V4 (colonie incolore a centre vert)	-		Levures, Coccies G(+), Bacilles G(-) incurvés
V5 (colonie incolore a centre vert)	-	+	Coccies G(+), Bacilles G(-)

P : peau , b : branchies , v : viscères.

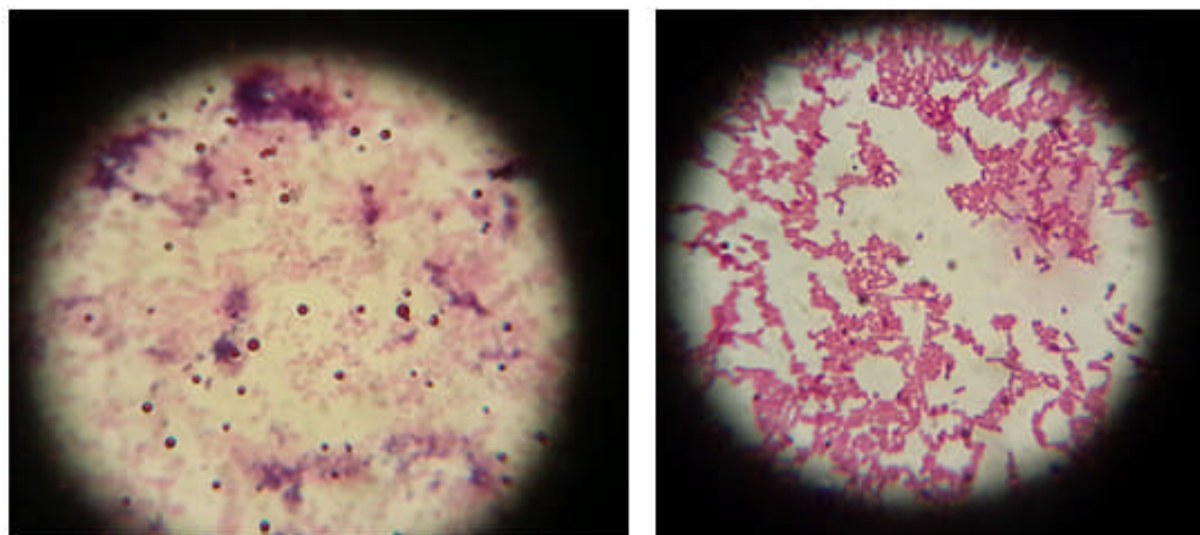


Figure (13) : Coloration de Gram des colonies sur milieu TCBS avec Gx100.

III.3. Résultats et discussion de la recherche du genre *Aeromonas* :

L'ensemencement sur milieu **Columbia au sang** des différents échantillons prélevés au niveau des sites (peau, branchies, viscères), les colonies qui poussaient sur milieux gélosés (à température ambiante et à 37°C), avaient les propriétés suivantes :

- Coloration : grisâtre
- Les colonies sont confluentes
- Les colonies poussaient en nappes
- Apparition sur milieu ensemencé de zone d'activité hémolytique β
- Colonies bombées
- L'observation de zones d'éclaircissement entourant les colonies dues à l'activité β -hémolytique prouve que les bactéries ont détruit les globules rouges.



Figure (14) : Observation macroscopique des souches d'*Aeromonas* qui possent sur milieu Columbia au sang.

III.3.1. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu S-S :

Les résultats obtenus sur milieux **S-S** ensemencés sont :

- Présence de colonies à coloration noire

Le milieu **S-S** est censé être inhibiteur pour les souches d'*Aeromonas*, pour certaines souches il y a eu croissance. Ce résultat indique la présence d'autres germes.

III.3.2. Résultats et discussion de l'ensemencement sur milieu PCA hypersalée (6,5 %) de NaCl :

On a remarqué une croissance sur milieu PCA hypersalée ce qui confirme que la culture n'est pas pure.

III.3.3. Résultats et discussion du caractère psychrophile des souches du genre *Aeromonas* :

L'ensemencement en spots sur gélose Columbia et l'incubation à 10°C dans le réfrigérateur pendant deux semaines ont mis en évidence l'existence du genre *Aeromonas* :

- ✓ Culture bactérienne observée dans les boîtes
- ✓ Activité β -hémolytique avec zones de transparence

III.3.4. Résultats et discussion des réactions d'oxydase-catalase :

Concernant les tests de l'oxydase et de la catalase les résultats indiquent que les souches testées produisent les deux enzymes.

III.3.5. Résultats et discussion de la coloration de Gram :

Concernant l'observation microscopique des colonies, nous avons trouvé différentes formes de bactéries :

- Abondance des bacilles G(-) : qui prouve probablement l'existence des *Aeromonas*. (Garrity et al, 2004 ; Reith et al, 2008 ; Boone et al, 2001).
- Abondance de cocci G(+) et G(-), de levures : qui souligne le caractère polybactérien des colonies.

Tableau (6) : Résultat des tests de l'oxydase et catalase et observation microscopique des souches du genre *Aeromonas* présumées.

échantillons	Oxydase	Catalase	Observation microscopique après coloration de Gram
CS P ₁	+	+	Coccies G(+)
CS P ₂	+	+	Coccies G(+)

CS P ₃	+	+	Coccies G(+), et G(-), Levures, Bacilles G(-)
CS P ₄	+	+	Coccies G(+), Bacilles G(-)
CS P ₅	+	+	Bacilles G(-), Levures
CS B ₁	+	+	Coccies G(+), Bacilles G(-) allongés et fins
CS B ₂	+	+	Coccies G(-), Bacilles G(-), Levures
CS B ₃	+	+	Coccies G(+), Bacilles G(-), Levures
CS B ₄	+	+	Coccies G(+)
CS B ₅	+	+	Bacilles G(-), Levures
CS V ₁	+	+	Bacilles G(-), Levures Coccies G(+)
CS V ₂	+	+	Coccies G(+), peut G(-), Bacilles G(-), Levures
CS V ₃	+	+	Bacilles G(-) fins, Levures
CS V ₄	+	+	Coccies G(-), peut de G(+), Levures, Bacilles G(-), Coccobacilles G(-)
CS V ₅	+	+	Coccies G(+), et G(-), Levures

P : peau , b : branchies , v : viscères.

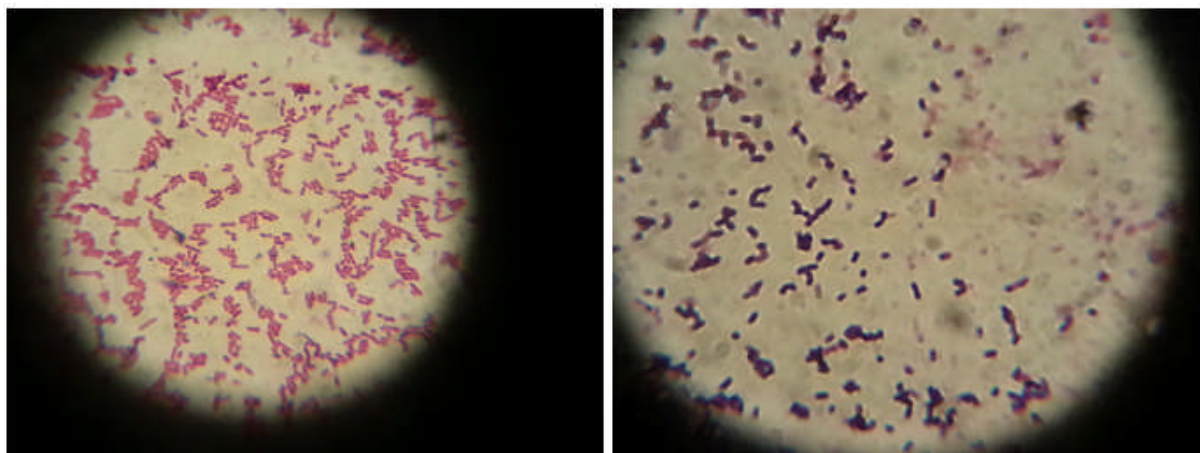


Figure (15) : Coloration de Gram des colonies sur milieu Columbia au sang avec Gx100.

III.4. Résultats et discussion de la recherche de la flore fongique :

L'ensemencement sur milieu **Sabouraud** des différents échantillons prélevés au niveau des sites (peau, branchies, viscères), les colonies qui poussaient sur milieux gélosés (à température ambiante et à 37°C), avaient les propriétés suivantes :

- Production de mycélium (masse cotonneuse à la périphérie) avec centres de colorations ; noir, rose, vert et blanc.
- L'ajout de l'antibiotique à la gélose a inhibé toute croissance.

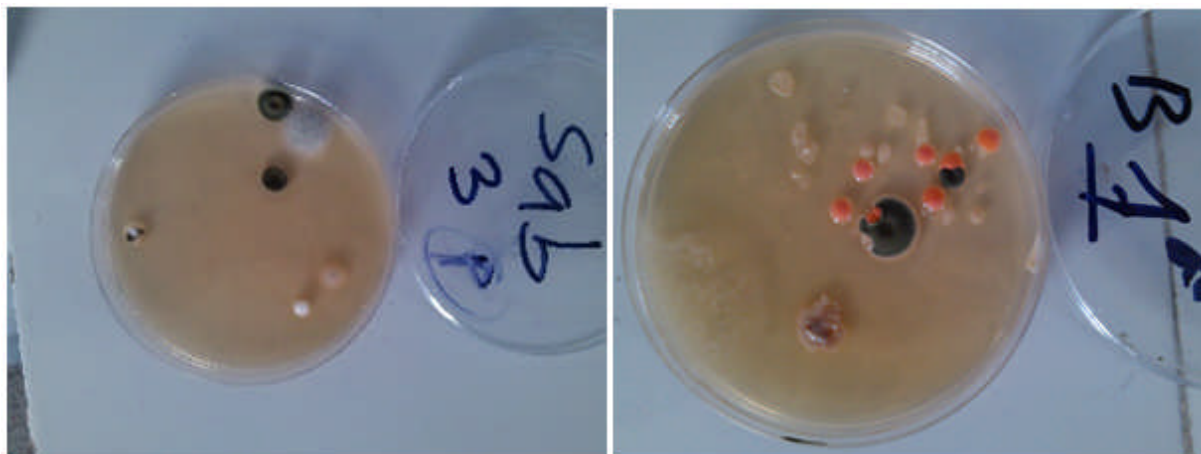


Figure (16) : Observation macroscopique des souches fongiques sur milieu Sabouraud.

Conclusion Générale

Conclusion

Le bassin aquacole est naturellement affecté par des bactéries qui participent à l'équilibre écologique du bassin. Généralement ces bactéries vivent de manière saprophyte avec les poissons. Les infections bactériennes ou/ou fongiques se développent à la suite d'un stress soutenu et lors d'une baisse des défenses immunitaires des poissons.

Dans cette étude nous avons tenté de chercher et de caractériser certains micro-organismes responsables d'infection chez le poisson rouge d'ornement.

L'analyse microbiologique a porté sur la recherche et la caractérisation des bactéries pathogènes des genres *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* et la flore fongique.

D'après les résultats obtenus des échantillons analysés nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- la présence d'une flore fongique abondante.
- La présence des germes du genre *Vibrio*.
- La présence des germes du genre *Aeromonas*.
- La présence des germes du genre *Pseudomonas*.

Ces germes n'ont pas été isolés de manière à obtenir des souches pures.

Des repiquages successifs, des dilutions, l'ajout de l'acide salicylique n'ont pas permis la purification des souches. Ces résultats peu satisfaisants peuvent être expliqués par :

- Le prélèvement initial est forcément poly-microbien donc il s'agit d'une poly-flore.
- Le mucus qui couvre le corps des poissons permet une très bonne adhérence des germes les uns aux autres.
- La production d'une quantité très importante de biofilm notamment par les *Aeromonas* et les *Pseudomonas* rend toute séparation quasi impossible.
- Le manque de temps pour réaliser plus de repiquage afin de mieux purifier les souches testées.

Références Bibliographiques

Bibliographies

Anonyme 1 : <http://www.lepoissonrouge.org/index.php/les-poissons-rouges/les-varietes> [archive].

Anonyme 2 : [Aqua bases](#), 2013.

Anonyme 3 : Association Française du Poisson Rouge, 2013.

Anonyme 4 : <http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

Anonyme 5 : in www.biokardiagnostic.org (consulté en avril, mai et juin 2013).

Anonyme 6 : 2010. Guide des bonnes pratiques d'hygiène et application de l'HACCP – Vol 6 – Poissons frais, surgelés ou congelés. 207-212.

Anonyme 7 : [J Fish Dis](#). 2007 May; Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium. 30(5):257-68. eltobbac.tobback@ugent.be.

Alsina, M. & Blanch, R. A. A. 1994. Set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species *J Appl Bacteriol.* 79-85.

Austin, B. & Austin, D.A. 1993. Bacterial Fish Pathogens. Diseases in Farmed and Wild Fish. Second Edition. Ellis Horwood, 384 pp.

Austin, B., Austin, D.A. 1987. *Aeromonads* : Dans Bacterial fish pathogens. Chap. 9, Ellis Horwood, New York, NY. 111-195.

Axelrod H.R., Emmens C.W., Sculthorpe D., Vorderwinkler W., Pronek N. & Burgess W.E. 1977. Poissons exotiques d'aquarium d'eau douce.

Baltar, J. 1994. Surveillance and monitoring systems for animal diseases. OIE Comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to Regional Commissions. 67 - 71.

Boone, DR., Castenholz, RW., Garrity, GM. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology / George M. Garrity, editor-in-chief. 2nd edn. New York: Springer.

Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*. 51-63.

Bourgeois, M. 1976. Poissons rouges - élevage et reproduction. Éditions Bornemann. 39.

Branson, E. 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Veterinary Record* **151**: 539-541.

Bruno, D. W. et B. P. Wood. 1999. *Saprolegnia* and other oomycetes. *Fish Diseases and Disorders*. 599-659.

Clave, D. 2010. Laboratoires de bactériologie hygiène CHU Toulouse. 2-4.

Daher, RK., Filion, G., Tan SG., Dallaire-Dufresne, S., Paquet, VE., Charrette, S J. 2011. Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Vet Microbiol.*

Bibliographies

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. 476 p.

Euzeby, J.P. 2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.

Fischer-le Saux M ; D. Hervio-Heath, S.Loaec, R.R. Colwell and M. Pommepuy.2002. detection of Cytoxin-Hemolysin mRNA in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical *Vibrio vulnificus* Strains in Artificial Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 5641-5646.

Gay, M., Berthe, F.C., Le Roux, F. 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 49-56.

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. 2004. Taxonomie outline of the prokaryotes Bergey's manual® of systematic bacteriology, second edition. New York: Bergey's manual trust.

Gieseke, C. M., Serfling, S.G et Reimschuessel, R. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **253**: 120-129.

Girard, P., et F. Lefebvre. 2001. Atelier pathologie - Compte-rendu de la séance du vendredi 29 juin 200 - Station Biologique de la Tour du Valat (13). 37 p.

Guiraud, J.P. 2003. Microbiologie alimentaire. Paris : DUNOD RIA. 652 p.

Holloway, B. W. 1992. *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, B Witholt,eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.

Howe, G. E. et G. R. Stehly, 1998. Experimental Infection of Rainbow Trout with *Saprolegnia parasitica*. *Journal of Aquatic Animal Health* **10**: 397-404.

Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W. et Vasta, G.R. 1999. Emerging Marine Diseases--Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science* 285p. 1505-1510.

Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S. et Samuel, M.D. 2002. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science* 296p.2158-2162.

Håstein, T. 1994. Disease problems, use of drugs, resistance problems and preventive measures in fish farming world wide. Proceedings of the first International Symposium on Sustainable Fish Farming, Oslo, Norway, AA. Balkema, Rotterdam, Brookfield, eds. Reinertsen H. & Haaland H., 183-194.

Hussein, M. M. A., Hatai, K., Nomura, T. 2001. Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. *Journal of Wildlife Diseases.* 204-207.

Ifremer, 1986.

Bibliographies

- Igbinosa, E.O. et Okoh, A.I. 2008. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Research in Microbiology* 159p.495-506.
- Inglis, V., Roberts R.J. & Bromage, N.R. 1993. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications, 312.
- Ishiguro, E.E., Kay, W.W., Ainsworth, T., Chamberlain, J.B., Austen, R.A., Buckley, J.T., Trust, T.J. 1981. Loss of Virulence during Culture of *Aeromonas-Salmonicida* at High-Temperature. *J Bacteriol.* 333-340.
- Jones, N. P., Arnason, J. T., Abou-Zaid, M., Akpagana, K., Sanchez-Vindas, P., Smith, M. L. 2000. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology.* 19-191.
- Lacroix, R.2011. Les poissons rouges : Les connaître, les nourrir et les soigner - Installer et entretenir l'aquarium. 64 p.
- Latour, X. and Lemanceau, P. 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie.* 427–443.
- Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* **29**: 470–489.
- Liu, P. & Lee., K. LeRoux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J. & Berthe, F. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events *Aquat Living Resour.* 251-258.
- Meyer, F. P. 1991. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* **69**: 4201-4208.
- Mayer K., 2000. Page consultée le 10 juin 2009. *Saprolegnia*: there's a fungus among us?, [En ligne], URL: http://tnfish.org/FishDiseasesParasites_TWRA/files/Saprolegnia.pdf.
- Murray, A.G et Peeler, E.J. 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine.* 223-235.
- Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B. 2004. Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis. 3-44.
- Palleroni, N.J., 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P. (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium. 1–18.
- Palleroni, N.J. 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York. 323–379.
- Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA. 141–171.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, **9**: 1132–1147.

Bibliographies

Pickering, A.D. et Willoughby, L.G. 1982. *Saprolegnia* infections of salmonid fish. *Microbial disease of fish*: 271-297.

Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P. and Gibbs, P. A., 2002. Modified pseudomonas agar: new differential medium for the detection/ enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. *J. Microbiol. Meth.* **49** : 69–74.

Raoult, D.1998. Dictionnaire de maladies infectieuses : diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomatologie. Editions Elsevier.1162p.

Référence World Register of Marine Species : espèce *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) (en) Sous-espèce *Carassius auratus auratus*.

Reith, M.E., Singh, R.K., Curtis, B., Boyd, J.M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J.H., Johnson, S.C., Brown, L.L.2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics.* 9:427.

Saulnier, D., Reynaud, Y., Arzul, I., Miossec, L., Leroux, F. et Goarant, C. 2007. Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole: quelques scénarios illustrés d'exemples. *INRA Productions Animales* 20.

Seenevaragachetty, J. 2013. Approches biologiques pour la prévention et le traitement de la moisissure aquatique, *saprolegnia parasitica*, chez le poisson 8p.

Stueland, S., Hatai, K., Skaar, I. 2005. Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. Strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **28**: 445-453.

Stuber, K., Burr, S.E., Braun, M., Wahli, T., Frey, J. 2003. Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *J Clin Microbiol* 41:3854-3856.

Stoskopf, M.K.1992. *Fish Medecine*. Saunders, W.B. (Éditeurs), Toronto, Ontario. 882 p.

Thompson, F. L., Iida, T. & Swings, J.2004. Biodiversity of *Vibrios* *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 403-431.

Thompson, C.C., Thompson, F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P. & Swings, J.2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae* *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 919-924

Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. 2006. *The biology of Vibrios*. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., ASM Press. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C. 423p.

Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A.T.R. et Sawabe, T. 2007. Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* Are Distinct Species. *Applied and Environmental Microbiology* 73. 4279-4285.

Van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist.* 99-104.

Bibliographies

Véron, M. 1965. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 5243-5246.

Vigneulle, M. 1981. Contribution à l'étude de la corynébactériose des salmonidés en France. *Thèse Doctorat Vétérinaire, Alfort, 128p.*

Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 22–30.

Voahanginirina, B.M.S. 1998. Contribution à l'analyse des *vibrio spp.* En élevages larvaires des crevettes *Penaeus mondon*. Mémoire de fin d'études, département Elevage, ESSA.104 p.

Whittington, R.J., Djordjevic, S.P., Carson, J. & Callinan, R.B. 1995. Restriction endonuclease analysis of atypical *Aeromonas salmonicida* isolates from goldfish *Carrasius auratus*, silver perch *Bidyanus bidyanus*, and greenback flounder *Rhombosolea tapirina* in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 185-191, 1995.

Willoughby, L.G.1985. Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *J. Fish Diseases*. 473-476.

Annexes

Annexe 1

- **Technique de préparation d'un milieu de culture**

La préparation dite classique d'un milieu de culture s'effectue suivant les démarches suivantes :

- Lire et interpréter la formule de préparation
- Rassembler les différents composants du milieu de culture
- Effectuer la pesée selon le calcul préalable du volume souhaité
- Dissoudre dans de l'eau distillée, ajuster le volume exact
- Répartir le volume final dans des récipients ; flacons stériles

N.B : l'opération de la stérilisation des milieux de culture se fait à l'autoclave 121°C pendant un quart d'heure, 120°C pendant 20 minutes pour les milieux de culture stérilisables.

2. composition des milieux de culture et réactifs :

Formules indiquées en gramme par litre d'eau distillée

Eau peptonée tamponnée (E.P.T)

Formule :

- Mélange de peptones..... 10,0
- Chlorure de sodium.....5, 0
- Di-sodium hydrogénophosphate.....3,5
- Dihydrogénophosphate de potassium.....1,5

Ph final = 7,2 à 25°C

Autoclaver 20 minutes à 120°C

Eau peptonée salée alcaline (E.P.S.A)

Formule :

- Peptone.....20,0
- Chlorure de sodium.....5,0

Additionner 40% de chlorure de sodium pour obtenir une solution hypersalée.

Autoclaver 15 minutes à 120°C

Gélose Columbia

Formule :

- Peptone
(mélange).....23,0
- Amidon.....1
- Chlorure de sodium.....5
- Gélose10

PH = 3,7 à 25°C

Autoclaver 15 minutes à 120°C, ajouter aseptiquement 5% de sang défibriné stérile(Guiraud, 2003).

Mode d'action:

- les peptones qui rentrent dans la composition du milieu favorisent l'excellente croissance des colonies.
- l'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.
- l'amidon est un détoxifiant, également source d'énergie.
- le sang humain défibriné qui est rajouté au milieu, favorise la détection des réactions hémolytiques (ANONYME 2 , 2010).

Gélose Hektoen

Formule :

- Mélange de peptone.....13,8
- Extrait de levure.....2,0
- lactose.....12,0
- Saccharose.....12,0
- Salicine.....1,0
- Chlorure de sodium.....5,0
- Tauroglycocholate de sodium.....6,5
- Thiosulfate de sodium.....1,25
- Citrate d'ammonium ferrique.....1,25
- Bleu de bromothymol.....0,065
- Fuschine acide.....0,1
- Agar.....14,0

PH= 7,6 à 25°C

Mode d'action:

- Le lactose inhibe les bactéries à Gram +
- le lactose et le saccharose sont des disaccharides ; la salicine est glucoside de la saligénine(alcool salicylique + glucose). Ces trois sucres peuvent être fermentés par certaines entérobactéries en produisant des acides qui font virer le bleu de bromothymol et la fuschine acide (indicateurs colorés) au jaune saumon : test (sucre +); dans le cas contraire, la coloration est bleu-vert ; donc test (sucre -)
- la peptone de viande et éventuellement le thiosulfate de sodium constituent deux sources de soufre. le soufre peut être réduit par certaines entérobactériens en

H₂S; ce dernier réagit avec le citrate de fer ammoniacal du milieu pour donner du sulfure de fer qui colore en noir le centre des colonies (Dellaras,2007).

Gélose Sabouraud

Formule:

- peptone de viande (bovin ou porcin).....3
- peptone de caséine (bovin).....3
- peptone de soja.....3
- extrait de levure.....2
- extrait de malt.....1
- Glucose.....19
- Phosphate monopotassique.....0,5
- Phosphate disodique..... 0,5
- Agar.....13

PH = 6,4 à 25°C

Autoclaver 20 minutes à 120°C. Additionner un antibiotique (Amoxicilline 0,5g/l).

Mode d'action :

- la présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le ph acide du milieu favorisent la croissance des levures.
- l'addition de l'antibiotique inhibe toute croissance bactérienne.
- **Gélose Thiosulfate Citrate Bile Saccharose TCBS**

Formule :

- peptone de caséine.....5
- peptone de viande.....5
- extrait de levure.....5
- citrate de sodium.....10
- Thiosulfate de sodium.....10
- bile de boeuf dessechée.....5
- Cholate de sodium.....3
- Saccharose.....20
- Chlorure de sodium.....10
- Citrate terrique.....1
- Bleu de thymol.....40 mg
- Bleu de bromothymol.....40mg
- Gélose.....14
- PH= 8,6 stérilisé par 5 minutes d'ébullition (ne pas autoclaver), (Guiraud, 2003).

Mode d'action:

- les concentrations élevées en thiosulfate et en citrate de sodium ainsi que la forte alcalinité du milieu inhibent fortement la croissance des entérobactéries.
- la bile de bœuf et le cholât de sodium ralentissent la culture des entérocoques et inhibent le développement des germes à Gram négatif.

- Par acidification du milieu, résultant de la fermentation du saccharose, les *Vibrio* provoquent le virage au jaune de l'indicateur au thymol et au bleu de bromothymol.
- A partir du thiosulfate, qui constitue une source de soufre, la production de sulfure d'hydrogène est révélée en présence de citrate ferrique. Tous les *Vibrio* sont H₂S-négatifs (ANONYME,2010).

Fuchsine de Ziehl

- Fuchsine basique..... .1
- Alcool éthylique à 90°10ml
- Phénol.....5
- Eau distillée.....100ml.

Lugol

- Iode.....1
- Iodure de potassium.....2
- Eau distillée.....300ml

Violet de gentiane

- Violet de gentiane.....1
- Ethanol à 90°10ml
- Phénol..... 2
- Eau distillée.....100ml