

UNIVERSITE BLIDA 1
Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

en Sciences Vétérinaires

Spécialité : Sciences Vétérinaires

EFFET DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA CONTAMINATION DES POISSONS

ISSUS DE DIFFERENTS TYPES D'ELEVAGE AQUACOLE

Par

Djamal MOKRANI

Devant le jury composé de :

R. KAIDI	Professeur, U. Blida 1	Président
N. MENOUEI	Professeur, U. Blida 1	Examineur
K. AIT OUDHIA	Professeur, ENSV. Alger	Examinatrice
M. OUMOUNA	Professeur, U. Yahia FARES, Médéa	Promoteur
A. CUESTA	Professeur, U. de Murcia, Espagne	Co-promoteur
N. BENSEGUENI	Ancien cadre supérieur, MPRH	Invité

Blida, 2019

Résumé

La pisciculture dans les étangs avec de l'eau chauffée offre une meilleure croissance des poissons par rapport aux fermes dans la température naturelle de l'eau de mer, mais l'augmentation de la température favorise le développement de bactéries et de maladies des poissons. Ainsi, dans cette étude, des échantillons du bar européen appelé aussi loup de mer en Algérie (*Dicentrarchus labrax*) élevés dans des étangs avec de l'eau chauffée d'une centrale électrique présentant des symptômes d'une maladie de type vibriose visaient à caractériser la communauté bactérienne ainsi que certains paramètres métaboliques et immunitaires dans le sang.

Une analyse bactériologique a été réalisée pour isoler et identifier les espèces pathogènes potentielles. L'eau a révélé une contamination importante avec des coliformes fécaux, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, levures et moisissures alors que les tissus de poissons provenant des échantillons sains et malades étaient positifs pour la flore aérobie totale et plusieurs potentiels.

Des bactéries pathogènes telles que *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris* et *P. mirabilis*. De plus, *Grimontia hollisae* n'était présent que dans les tissus des poissons malades.

Les paramètres métaboliques sériques étaient généralement augmentés chez les poissons malades, mais seuls les taux de phosphore atteignaient un niveau significatif par rapport aux échantillons sains. Concernant l'immunité innée du poisson, nos résultats n'ont montré aucune différence statistique entre les poissons sains et malades sur l'activité peroxydase, protéase ou antiprotéase alors que l'activité bactéricide contre *V. anguillarum* était significativement diminuée chez les poissons malades. Enfin, l'expression génique de la protéine a1b, c3, dic et mpx a été régulée à la baisse dans le sang des poissons malades, tandis que la régulation de la pression artérielle a été régulée à la hausse. D'autres études sont nécessaires pour déterminer cette maladie de type vibriose dans le bar européen ainsi que les avantages ou les problèmes potentiels associés à la culture intensive utilisant des eaux chauffées.

De plus, le poisson se détériore rapidement, le stockage par refroidissement dans la glace est une technique courante pour prolonger sa fraîcheur et sa qualité. La présente étude a comparé la durée de conservation et la qualité du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) préservé dans la glace provenant de deux systèmes d'élevages piscicoles intensifs différents, des étangs terrestres utilisant de l'eau chauffée d'une centrale électrique et des cages flottantes en pleine mer.

En utilisant l'analyse sensorielle, les poissons cultivés dans les étangs d'eau chauffés ont été rejetés comme inacceptables pour la consommation après 13 jours, tandis que les poissons élevés dans les cages flottantes ont été rejetés après 15 jours. La flore mésophiles aérobie total (FMAT), le pH, l'azote basique volatil total (ABVT) et la triméthylamine (TMA) étaient systématiquement plus élevés chez les poissons élevés dans des étangs d'eau chaude. L'acceptabilité chimique, bactériologique et organoleptique a démontré que les conditions d'élevage étaient importantes pour le stockage et qu'il fallait en tenir compte dans la gestion et la transformation du poisson.

Cette étude démontre que non seulement la méthode de stockage affecte la fraîcheur et la qualité des produits de la pêche mais aussi l'environnement et les conditions d'élevage de pisciculture. Le type d'élevage peut influencer sur la durée de conservation du poisson. La Mauvaise qualité de l'eau, et les étangs inadéquats (manque d'hygiène, surpopulation) causent la contamination du poisson.

Mots-clés : Aquaculture, *Dicentrarchus labrax*, Environnement, Vibriose, Immunité, expression génique, analyse sensorielle, analyse chimique, analyse bactériologique.

Abstract

Fish culture in ponds with heated water offers better fish growth compared to farms in natural sea water temperature, but the increase in temperature favors the development of bacteria and fish disease. Thus, in this study, in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) specimens reared in ponds with heated water from a power plant showing symptoms of a vibriosis-like disease we aimed to characterize the bacterial community as well as some metabolic and immune parameters in the blood. Bacteriological analysis was carried out to isolate and identify the potential pathogenic species. Water revealed an important contamination with fecal coliforms, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, yeasts and molds whilst fish tissues from both healthy and diseased specimens were positive for total aerobic flora and several potential pathogenic bacteria such as *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris* and *P. mirabilis*. Additionally, *Grimontia hollisae* was only present in diseased fish tissues. Serum metabolic parameters were generally increased in diseased fish though only the levels of phosphorous reached a significant level compared to the healthy specimens. Regarding fish innate immunity, our results showed no statistical differences between healthy and diseased fish on peroxidase, protease or antiprotease activity while the bactericidal activity against *V. anguillarum* was significantly decreased in diseased fish. Lastly, the gene expression of *il1b*, *c3*, *dic* and *mpx* was down-regulated in the blood of diseased fish while *ighm* was up-regulated. Further studies are needed to ascertain this vibriosis-like disease in European sea bass as well as the potential benefits or problems associated with the intensive culture using heated waters.

However Seafood rapidly deteriorates, storage by cooling in ice is a common technique for prolonging its freshness and quality. The current study compared the shelf life and quality of ice-preserved European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sourced from two different intensive fish farming systems : terrestrial ponds using heated water from a power plant and floating cages in the open sea. Using sensory analysis, the fish cultured in the heated water ponds were rejected as unacceptable for consumption after 13 days, while the fish reared in the floating cages were rejected after 15 days. Total viable counts of aerobic bacteria, pH, total volatile basic nitrogen and trimethylamine levels were consistently higher in the fish cultured in

heated water ponds. Chemical, bacteriological and organoleptic acceptability demonstrated that fish rearing conditions were important for storage and needs to be taken into consideration for fish management and processing.

Keywords: Aquaculture, *Dicentrarchus labrax*; Environment, Vibriosis; Immunity, gene expression, Sensory analysis, Chemical analysis, Bacteriological analysis.

Remerciements

Le grand merci c'est à Dieu " Le puissant" qui m'a aidé de réaliser ce travail.

Un très grand merci aussi à mon directeur de thèse **Pr Mustapha OUMOUNA**, de la confiance qu'il m'a témoigné en m'accordant la réalisation de ce projet de recherche. J'ai bénéficié d'un très bon encadrement et de précieux conseils qui m'ont permis de mener ce projet de recherche le mieux possible. Merci de m'encourager à continuer faire de la recherche.

« **Sincère reconnaissance** »

Je voudrais remercier mon Co-encadreur **Pr Alberto CUESTA**, pour avoir accepté de co-diriger mes travaux de recherche, afin que j'arrive au bout de ces années avec des résultats à présenter. Ces années de recherche à ses côtés m'ont beaucoup appris et vont m'aider pour la suite de ma carrière professionnelle et scientifique. À ce propos, merci Monsieur, de m'avoir appris des outils bien utiles. Merci d'avoir eu l'idée de cette collaboration.

« **Hommage pour son humanisme prodigieux** »

Je remercie le Professeur Rachid KAIDI, pour avoir accepté d'assurer la présidence de jury de ma thèse.

« **Meilleure gratitude** »

Je remercie tous particulièrement :

Professeur Nabil Menouiri, ainsi que, Professeur Khatima Ait Oudhia, d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.

« **Hommages respectueux** »

Je remercie vivement et avec un profond respect l'homme qui a été le premier à guider nos pas au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, MR **Nadir BENSEGUENI**, Pour tous les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé

de prodiguer pour le bon aboutissement de ce travail, qu'il soit assuré de notre estime la plus profonde et de notre indéfectible attachement.

Mes sincère remerciements vont également au **Colonel Oulhadj LATRACHE**, directeur du Laboratoire Central de l'Intendance de l'Armée National Populaire, et à tout le personnel du laboratoire à savoir **Sihem MERZOUGUI** du service microbiologie alimentaire.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé et collaboré au laboratoire de recherche de l'Université de Murcie, Département de biologie cellulaire et d'histologie, Faculté de biologie, Groupe de recherche sur le système immunitaire innés des poissons, Espagne : Rebeca Cerezuela, Héctor Cordero, Yulema Valero, Francisco A. Guardiola.

Je voudrais enfin, remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Et enfin, je dois dire un grand merci à ma famille qui m'a toujours soutenue pendant tout mon parcours jusqu'aujourd'hui. Je pense que, maintenant que vous savez ce que c'est qu'une thèse.

Pour terminer, je remercie tous ceux que j'ai involontairement oublié....

« **Sincères remerciements** »

TABLE DES MATIERES

Résumé	2
Remerciements	6
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	11
INTRODUCTION	13
AQUACULTURE, DEFINITION ET SITUATION MONDIALE ET NATIONALE	17
1.1. Définition d'aquaculture	17
1.2. Production aquacole mondiale	17
1.3. Aquaculture nationale	17
LE BAR : <i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>	19
2.1. Présentation	19
2.2. Mode d'élevage en pisciculture marine	20
2.2.1. Les écloseries	20
2.2.2. Elevage en cages flottantes	22
2.2.3. Elevage en bassins ou étangs	22
EFFET DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA CONTAMINATION DES POISSONS D'AQUACULTURE	23
SYSTEME IMMUNITAIRE DES POISSONS OSSEUX	29
4.1. Système immunitaire non spécifique	29
4.2. Système immunitaire spécifique	30
4.3. Effet de l'environnement sur le système immunitaire du poisson	30
LES MODIFICATION POST- MORTEM DU POISSON	32
5.1. Microbiologie du poisson vivant	32
5.2. Changements organoleptiques post-mortem	33
5.3. L'invasion microbienne	34
5.4. Le poisson substrat pour les bactéries	35
5.5. Réduction de l'O.T.M.A. en T.M.A	35
5.6. Dégradation des acides aminés	36
5.7. Dégradation des protéines	38
5.8. Dégradation des nucléotides	38
5.9. Dégradation des lipides	38
LES METHODES D'APPRECIATION DE LA QUALITE DU POISSON FRAIS	39
6.1. Méthodes organoleptiques	39
6.1.1. Description des caractères d'altération	40
6.1.2. Barème de cotation de fraîcheur européen	41
6.1.3. La méthode de l'indice de qualité	42
6.2. Méthodes utilisant le dosage de composés chimiques	43

6.2.1. Evolution de la concentration des différentes amines volatiles durant le stockage sous glace :	43
6.2.2. pH	45
6.2.3. Dosage des amines biogènes	46
6.2.4. Dosage des métabolites de l'ATP	47
6.2.5. Analyse des composés volatils	49
6.3. Méthodes microbiologiques	52
EFFET DES PRATIQUES D'ELEVAGE SUR LA CONTAMINATION ET LA REPOSE IMMUNITAIRE DU BAR (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>) CULTIVE DANS DES ETANGS AVEC DE L'EAU CHAUFEE	54
7.1. Problématique	54
7.2. Matériel et méthodes	56
7.2.1. Caractérisation de la ferme aquacole et présentation des cas	56
7.2.2. Échantillonnage des poissons et de l'eau	58
7.2.3. Analyse microbiologique d'échantillons d'eau et de tissus	58
7.2.4. Détermination des paramètres métaboliques dans le sérum	61
7.2.5. Paramètres immunitaires innés du sérum	61
7.2.6. L'expression des gènes par PCR en temps réel (PCRq)	64
7.3. Analyses statistiques	64
7.4. Résultats	66
7.4.1. Analyse microbiologique des échantillons	66
7.4.2. Paramètres métaboliques dans le serum	69
7.4.3. Paramètres immunitaires innés du sérum	70
7.4.4. Expression des gènes liés à l'immunité	73
7.5. Discussion	74
EFFET DES CONDITIONS ET DU TYPE D'ELEVAGE SUR LA QUALITE ET LA DUREE DE CONSERVATION DU BAR STOCKE SOUS GLACE A TEMPERATURE (0 – 3°C)	79
8.1. Problématique	79
8.2. Matériel et Méthodes	82
8.2.1. Échantillonnage	82
8.2.2. Méthodes d'analyses effectuées	84
8.2.2.1. Examen sensoriel	84
8.2.2.2. Analyses bactériologiques	84
8.2.2.3. Analyses chimiques	85

8.2.3. Analyses statistiques	88
8.3. Résultats	89
8.3.1. Analyse sensorielle	89
8.3.2. Résultats bactériologiques	91
8.3.3. Analyses chimiques	92
8.4. Discussion	99
8.4.1. Appréciation organoleptique	99
8.4.2. pH	100
8.4.3. ABVT (Azote Basique Volatil Total)	101
8.4.4. TMA (Triméthylamine)	102
8.4.5. Analyses bactériologiques	105
DISCUSSION GENERALE	107
Conclusion	112
Recommandations et perspectives	115
APPENDICE	116
A. LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS	116
B. Activité antiprotéase (sérum)	119
C. Activité protéase (sérum)	120
D. Activité Peroxydase (sérum)	121
E. Extraction d'ARN par Trizol®	123
F. Purification de l'ARN avec DNase I	124
G. Retrotranscription ARNm	124
H. Article	126
REFERENCES	131

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 2.1 :	La morphologie externe du bar <i>Dicentrarchus labrax</i>	19
Figure 2.2 :	Cycle de production du Bar, <i>Dicentrarchus labrax</i> - système intensif	21
Figure 5.1 :	Dégradation de l'urée sous l'action d'uréases bactérienne	36
Figure 6.1 :	Indices d'altérations utilisant les concentrations en amines biogène	46
Figure 6.2 :	Décarboxylation de l'histidine	47
Figure 7.1 :	Ferme de l'ONDPA (1), Djinet, Boumerdes	57
Figure 7.2 :	Etangs d'élevage, ferme ONDPA.	57
Figure 7.3 :	Activité de la peroxydase sérique.	70
Figure 7.4 :	Activité de la protéase sérique	70
Figure 7.5 :	Activité de l'antiprotéase sérique	71
Figure 7.6 :	l'activité bactéricide sérique contre <i>V. Anguillarum</i>	71
Figure 7.7 :	Taux d'immunoglobulines totales M (IgM)	72
Figure 7.8 :	Expression des gènes déterminée par PCR en temps réel dans le sang des spécimens du bar (<i>D. Labrax</i>) infectés par la vibriose	73
Figure 8.1:	Ferme de l'ONDPA (2), Djinet, Boumerdes	82
Figure 8.2 :	Ferme Hypone aquacole de Zemmouri, Boumerdes	83
Figure 8.3 :	Appareil de kjeldhal	86
Figure 8.4 :	Analyse microbiologique déterminant le nombre de la flore mésophile totale à 30°C, en log UFC / g, à partir du Bar européen stocké dans la glace et élevé dans deux types d'élevages différents.,	91

Figure 8.5 :	Evolution de l'ABVT, la TMA, le pH et la catégorie de qualité du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) issus d'élevage intensif dans des étangs, conservé sous glace à 0-3C°	92
Figure 8.6 :	Evolution de l'ABVT, la TMA, le pH et la catégorie de qualité du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) issus d'un élevage intensif en cages flottantes, conservé sous glace à 0-3C°	94
Figure 8.7 :	Évolution du pH du bar stocké dans de la glace (0°C-3°C) cultivé dans des étangs terrestres avec de l'eau chauffée ou des cages flottantes marines.	95
Figure 8.8 :	Évolution d'ABVT dans le bar stocké dans la glace (0°C - 3 °C) cultivé en milieu terrestre dans des étangs avec de l'eau chauffée ou des cages flottantes marines	96
Figure 8.9 :	Évolution de la TMA dans le bar stocké dans la glace (0°C - 3°C) cultivé en milieu terrestre dans des étangs avec de l'eau chauffée ou des cages flottantes marines	97
Tableau 2.1 :	Valeurs optimales de la température, de l'oxygène dissous et du pH pour les eaux d'élevage du bar et de la daurade en fonction de leur stade de développement	21
Tableau 2.2 :	Principales maladies rencontrées en aquaculture marine dans le monde	26
Tableau 2.3 :	Maladies du Bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	27
Tableau 5.1 :	Causes d'altération du poisson, en fonction du type de changement observé	33
Tableau 6.1 :	Description des caractères d'altération chez les téléostéens	40
Tableau 6.2 :	Catégories d'odeur du poisson perceptibles lors de son stockage et exemples de composés impliqués dans la formation de ces odeurs	50

Tableau 7.1:	Les amorces utilisées pour la PCR en temps réel	65
Tableau 7.2:	Analyse microbiologique des échantillons d'eau	66
Tableau 7.3:	Analyse microbiologique de tissus de poissons de <i>D. labrax</i> en bonne santé et maladies	67
Tableau 7.4:	Caractéristiques biochimiques (système d'essai API20E) de bactéries potentiellement pathogènes isolées de <i>D. labrax</i> malade	68
Tableau 7.5:	Paramètres métaboliques dans le sérum de spécimens sains ou malades du bar (<i>D. labrax</i>)	69
Tableau 8.1:	Résultats de l'analyse sensorielle du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) conservé sous glace issu de deux types d'élevage aquacole. E, extra; A, Bon; B, acceptable; NA, non-admis ou rejet.	90
Tableau 8.2 :	ABVT, TMA, pH du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) issus d'élevage intensif dans des étangs, conservé sous glace à 0-3C°	92
Tableau 8.3 :	ABVT, TMA, pH et catégorie de qualité du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) issus d'élevage intensif en cages flottantes, conservé sous glace à (0 – 3°C)	93
Tableau 8.4 :	Analyse ANOVA bidirectionnelle des données obtenues du bar élevé dans deux types d'élevage différents et conservé sous glace	98
Tableau 8.5 :	Corrélations observées entre les paramètres déterminés dans le bar européen.	98

INTRODUCTION

La sécurité alimentaire et la nutrition constituent un défi planétaire, car la faim et la malnutrition demeurent deux des fléaux les plus dévastateurs auxquels le monde doit faire face.

La sécurité alimentaire ne se limite pas à préserver les populations de la faim et de la malnutrition ; elle se caractérise par le fait que « toute la population a en tout temps un accès matériel et socioéconomique garanti à des aliments sans danger et nutritifs en quantité suffisante pour couvrir ses besoins physiologiques, répondant à ses préférences alimentaires, et lui permettant de mener une vie active et d'être en bonne santé » [1]

Le secteur de la pêche et de l'aquaculture joue un rôle prépondérant dans la sécurité alimentaire mondiale.

La pêche et l'aquaculture demeurent, pour des centaines de millions de personnes à travers le monde, une ressource de première importance, qu'il s'agisse de l'alimentation, de la nutrition, des revenus ou des moyens d'existence. En 2014, l'offre mondiale de poisson a atteint le chiffre record de 20 kg par habitant, à la faveur de la forte croissance de l'aquaculture, qui fournit désormais la moitié du poisson destiné à la consommation humaine, et d'une légère amélioration de l'état de certains stocks de poissons due à une meilleure gestion des pêches. En outre, le poisson continue d'être l'un des produits alimentaires de base les plus échangés dans le monde, et plus de la moitié des exportations en valeur proviennent de pays en développement. Les rapports récents établis par des experts de haut niveau, des organisations internationales, des entreprises du secteur et des représentants de la société civile soulignent tous la contribution considérable que peuvent, et surtout que pourront dans l'avenir, apporter les océans et les eaux intérieures à la sécurité alimentaire et à la nutrition d'une population mondiale qui devrait atteindre 9,7 milliards de personnes en 2050. [2]

Le risque sanitaire des pathologies des poissons d'élevage est lié au fait que l'élevage intensif révèle la présence des bio-agresseurs présents dans l'environnement aquatique et que ses bio-agresseurs sont "élevés" en même temps que les poissons. Il est donc essentiel de limiter l'incidence de ces bio-agresseurs

pour que l'élevage soit rentable. En effet, le coût économique des pathologies infectieuses est considérable dans l'industrie aquacole. Il inclut bien sûr la mortalité des poissons mais également les pertes commerciales liées aux manifestations cliniques qui rendent les poissons survivants impropres à la consommation ainsi que le coût des traitements curatifs mis en place pour lutter contre le pathogène. [3] L'Algérie essaie depuis de nombreuses années de diversifier sa production aquacole en quantité et en qualité. La tendance actuelle est sans doute le développement de la structure de pisciculture marine, comme le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) et la dorade (*Sparus aurata*) [4, 5]. Les technologies de production de poisson les plus courantes en Algérie, sont les cages flottantes dans les zones côtières, et les étangs terrestres. En ce qui concerne la pisciculture marine, il existe actuellement plusieurs projets en Algérie, dédiés à la daurade et au loup de mer (le bar). Cependant, le développement et la croissance rapides de l'aquaculture ont entraîné des foyers de maladies dans les exploitations piscicoles qui causent de graves pertes économiques et constituent un important facteur limitant pour l'aquaculture.

Ce travail a porté sur le loup de mer européen appelé aussi le Bar (*Dicentrarchus labrax*) élevé dans des étangs en utilisant l'eau chaude d'une centrale électrique en région de Cap jinet, et dans des cages flottantes dans la région de Zemmouri wilaya de Boumerdes. Ainsi, nous avons évalué l'apparition de pathogènes bactériens dans l'eau et les spécimens de loup de mer européen (*Dicentrarchus labrax*), l'état métabolique, biochimique et immunitaire, les paramètres sensoriels, chimiques et microbiologiques.

Le choix de porter notre étude sur le loup de mer ou le bar s'explique :

- Par l'intérêt économique de cette espèce dans chacune de ses aires de répartition géographique (Méditerranée, Atlantique Nord du Maroc à l'Irlande, Mer du Nord et Mer Baltique),
- Par la maîtrise de son élevage par rapport à d'autres espèces de poissons marins.
- Le loup de mer européen est probablement la plus importante espèce de poisson marin élevée dans la région méditerranéenne, il montre une forte valeur économique, principalement demandée dans des formats de poissons

entiers, éviscérés ou non, mais l'utilisation de chair en tranches prête à l'emploi est également devenue populaire. Quoi qu'il en soit, il est très apprécié par les consommateurs en raison de sa chair blanche, sa saveur douce et douce et son contenu faible en matières grasses.

Ce travail de recherche visait à atteindre les objectifs suivants :

- Etude de l'effet de l'environnement et des conditions d'élevage intensif dans des étangs (bassins) avec de l'eau chauffée sur la contamination des poissons de loup de mer et la réponse immunitaire de ces poissons.
- Evaluation bactériologique, biochimique, et immunologique de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) élevé dans des étangs avec de l'eau chauffée sous une pathologie de type vibriose.
- Etude de la durée de conservation sous glace de loup de mer issu de deux types d'élevage : pisciculture en étangs (bassins) et pisciculture en cages flottantes.
- Evaluation chimiques et bactériologiques de loup de mer issu de deux types d'élevage : pisciculture en étangs (bassins) et pisciculture en cages flottantes, conservé sous glace.
- Et enfin, Fournir des informations et tirer des conclusions basées sur les résultats de ce travail de recherche sur la méthode adéquate et le mode d'élevage préféré pour le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) compte tenu des conditions environnementales de la pisciculture en Algérie.

Ce travail a été divisé en deux parties distinctes portant sur chacun des aspects de cette recherche. La première section de cette partie présente la synthèse bibliographique. La seconde section traite la partie expérimentale.

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse, ont été réalisés au sein du laboratoire de l'intendance de l'armée nationale (Algérie) et dans le laboratoire de recherche de l'Université de Murcia, Département de biologie cellulaire et d'histologie, Faculté de biologie, Groupe de recherche sur le système immunitaire innés des poissons (Espagne).

Une partie de cette thèse a été publiée dans « Aquaculture » journal homepage : www.elsevier.com/locate/aquaculture:

Djamal Mokrani, Mustapha Oumouna, Alberto Cuesta. 2018. Fish farming conditions affect to European sea bass (*Dicentrarchus labrax* .) quality and shelf life during storage in ice. *Aquaculture*.490 (2018) 120–124.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.032>

Deux autres articles en relation avec la thèse sont soumis à d'autres revues (journal scientifique).

CHAPITRE 1

AQUACULTURE, DEFINITION ET SITUATION MONDIALE ET NATIONALE

1.1. Définition d'aquaculture

Le terme aquaculture est défini, selon la FAO par : « Elevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, plantes aquatiques...) avec pour conditions d'une part une intervention humaine dans le processus d'augmentation de la production et d'autre part une propriété industrielle ou juridique du stock en élevage. » [6]

1.2. Production aquacole mondiale

En 2014, la production de poisson du secteur de l'aquaculture s'est établie à 73,8 millions de tonnes, pour une valeur estimée à 160,2 milliards d'USD lors de la première vente, dont 49,8 millions de tonnes de poissons (99,2 milliards d'USD), 16,1 millions de tonnes de mollusques (19 milliards d'USD), 6,9 millions de tonnes de crustacés (36,2 milliards d'USD) et 7,3 millions de tonnes d'autres animaux aquatiques. La quasi-totalité de la production aquacole est destinée à la consommation humaine, quoique certains sous produits soient susceptibles d'être affectés à des usages non alimentaires. [2].

La pisciculture continentale pratiquée dans des étangs en terre est de loin l'activité aquacole qui contribue le plus à la sécurité alimentaire et à la nutrition du monde en développement, mais l'élevage en cage est de plus en plus fréquemment adopté lorsque les conditions le permettent. [2]

1.3. Aquaculture nationale

L'aquaculture algérienne connaît actuellement un grand essor en matière de production. Depuis la création du Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques en 2000, plusieurs plans et programmes de développement ont été élaborés permettant ainsi le démarrage de plusieurs projets privés d'aquaculture dans différentes filières d'activité. [7].

La production aquacole annuelle a régulièrement augmenté depuis 2004 (641 tonnes), jusqu'en 2012 où elle a dépassé les 2 600 tonnes toute filière confondue. Un Programme National de Développement de l'Aquaculture (2015-2019) est actuellement mis en œuvre. Des actions liées à des projets aquacoles publics et privés y sont planifiés. Les projets publics ont surtout un caractère de démonstration et de soutien à la production, alors que les projets privés portent sur des filières aquacoles de production à but commercial [7, 8].

Dans le cadre de la politique sectorielle de recherche, il a été procédé à la mise en place d'un Centre National de Recherche pour le développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA). Les travaux de recherche de ce centre seront dirigés beaucoup plus vers une recherche appliquée et servira d'outil de décision pour l'administration chargée de la pêche et de l'aquaculture en Algérie [7,8].

CHAPITRE 2

LE BAR : *DICENTRARCHUS LABRAX*

2.1. Présentation

Le Bar, *Dicentrarchus labrax* (appelé aussi loup de mer en Algérie et lubina en Espagne) poisson téléostéen, de l'ordre des Perciformes (sous ordre des Percoïdes) appartenant à la famille des Serranidae. Ce poisson est aussi connu sous le nom de loup de mer sur les côtes méditerranéennes, principal lieu de son élevage.

Le bar présente un corps assez allongé. Opercule avec 2 épines plates, préopercule avec de grandes épines, dirigées vers l'avant sur son bord inférieur. Bouche terminale, modérément protractile. Dents vomériennes en une bande formant un croissant sans extension sur la ligne médiane de la voûte de la bouche. Deux nageoires dorsales séparées, nageoire anale avec 3 épines et 10 ou 12 rayons mous. Petites écailles et une nageoire caudale modérément fourchue. Couleur grise argentée à bleuâtre sur le dos, argentée sur les côtés, ventre parfois teinté de jaune. Les jeunes peuvent avoir quelques taches sur le haut du corps mais pas les adultes. Il y a une tache noire diffuse sur le bord de l'opercule [9].

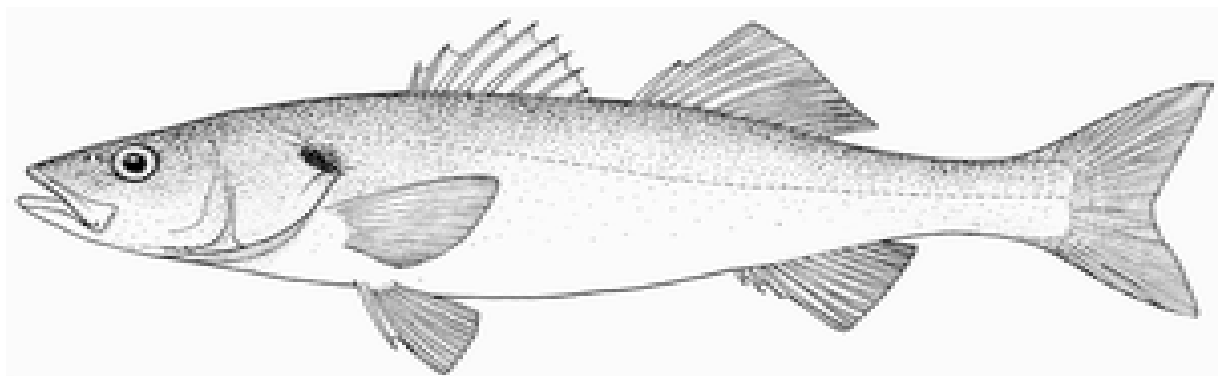


Figure 2.1 : La morphologie externe du bar *Dicentrarchus labrax* [8]

Position systématique :**Super-classe :** Poissons**Classe :** Ostéichthyens**Sous-classe :** Actinoptérygiens**Super-ordre :** Téléostéens**Ordre :** Perciformes**Sous-ordre :** Percoidei**Famille :** Moronidae**Genre :** *Dicentrarchus***Espèce :** *Dicentrarchus labrax*

Source : [10]

2.2. Mode d'élevage en pisciculture marine**2.2.1. Les écloseries**

Les écloseries sont installées à terre, c'est des unités à fort potentiel de production en système intensif et dans lesquelles sont réalisés le contrôle de la reproduction, l'élevage larvaire et le pré-grossissement de juvéniles. L'ensemble des écloseries intensives utilise maintenant des circuits en eau recyclée leur permettant de garantir une plus grande stabilité des paramètres physico-chimiques et bactériologiques du milieu d'élevage [11].

Le traitement d'eau vise à éliminer les particules et certains composés solubles par des filtres physiques, à éliminer les composés solubles excrétés par les poissons et notamment l'ammoniaque, produit final du métabolisme des protéines, par des filtres biologiques et à traiter l'eau pour la rendre compatible avec les besoins du poisson en oxygène, en température et en salinité [12].

Le tableau 1 montre les valeurs optimales de la température, de l'oxygène dissous et du pH pour les eaux d'élevage du bar et de la daurade en fonction de leur stade de développement.

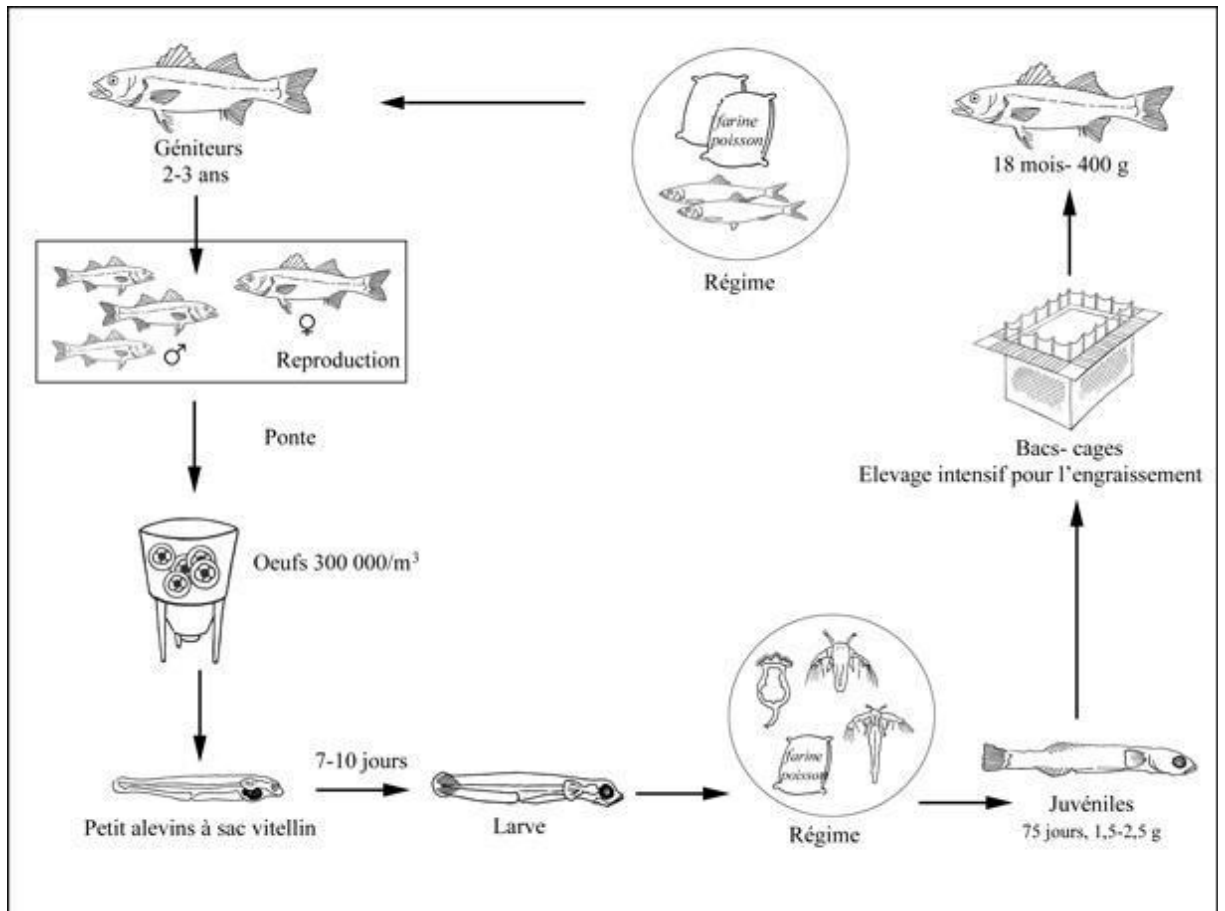


Figure 2.2 : Cycle de production du Bar, *Dicentrarchus labrax* - système intensif [9].

Le tableau 2.1 montre quelques valeurs physico-chimiques optimales des eaux d'élevage du bar et de la daurade :

Tableau 2.1 : Valeurs optimales de la température, de l'oxygène dissous et du pH pour les eaux d'élevage du bar et de la daurade en fonction de leur stade de développement [11].

	Larves	Juvéniles	Adultes
Température °c	16-20	22-24	22-24
Oxygène dissous (% saturation)	> 90	> 90	> 90
pH (mini - maxi)	7,5 - 8,3	6,5 - 8,3	6,5 - 8,3

2.2.2. Elevage en cages flottantes

Ce type d'élevage permet de bénéficier d'un renouvellement d'eau naturel et fait appel à des structures comparativement moins onéreuses que les implantations à terre. Ces structures sont le plus souvent flottantes, adaptées à des conditions extrêmement variables de houle, ou fixes, semblables à des tables conchylicoles, en zones très protégées et peu profondes. [12].

2.2.3. Elevage en bassins ou étangs

Le système d'élevage en bassins offre des possibilités de contrôle du milieu et du bien-être du poisson, mais requiert l'accès à des sites littoraux, des installations fixes avec des bâtiments, des circuits d'eau alimentés par pompage d'eau de mer ou d'eau salée sous terrain et de l'oxygène liquide. Ce système permet également une meilleure maîtrise de l'emploi de produits thérapeutiques et le lagunage des eaux avant rejet en mer. Une utilisation de l'eau en circuit fermé est parfois envisagée, ce qui permet un contrôle de tous les paramètres d'élevage tout en limitant la consommation d'eau et l'impact sur l'environnement [12].

CHAPITRE 3

EFFET DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA CONTAMINATION DES POISSONS D'AQUACULTURE

Le risque sanitaire des pathologies des poissons d'élevage est lié au fait que l'élevage intensif révèle la présence des bio-agresseurs présents dans l'environnement aquatique et que ses bio-agresseurs sont "élevés" en même temps que les poissons. [13]

L'environnement aquatique est une source de contamination importante, les pathogènes peuvent y survivre et parfois s'y multiplier. Les poissons eux-mêmes sont évidemment une importante source de contamination, qu'ils soient malades ou demeurés porteurs à la suite d'une infection clinique ou inapparente. [13]

De nombreuses espèces bactériennes sont pathogènes pour les poissons [14, 15,16].

Les infections les plus graves mettent en cause des *Aeromonadaceae*, des *Vibrionaceae*, des *Enterobacteriaceae* et des *Flavobacteriaceae*. La yersiniose à *Yersinia ruckeri*, la furonculose à *Aeromonas salmonicida*, et la flavobactériose d'eau froide à *Flavobacterium psychrophilum* sont fréquentes dans les élevages d'eau douce. En milieu marin, les productions aquacoles payent surtout un lourd tribut à la vibriose due à *Vibrio anguillarum*. Les infections à germes à Gram positif (*Vagococcus salmoninarum*, *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Carnobacterium piscicola*...) progressent partout [13].

Les pathologies en aquaculture peuvent être induites par diverses origines incluant des facteurs abiotiques liés aux conditions de l'environnement atmosphériques et aquatiques, aux facteurs physico-chimiques, biotiques liés aux espèces élevées (poissons, mollusques, crustacés), aux facteurs somatiques spécifiques (conditions génétique, organique et fonctionnelle) et anthropiques (activité humaine, pollution, procédés technologiques d'élevage) [13].

Dans les produits de la pêche et d'aquaculture, il y a les bactéries indigènes que l'on trouve de façon naturelle sur les poissons et les bactéries non-indigènes qui sont apportées lors de la manipulation du produit (contamination par le personnel et/ ou l'environnement de la ferme aquacole ou de l'entreprise). La recherche des

microorganismes aérobies à 30°C peut indiquer une altération du produit. Les coliformes fécaux permettent de déceler une contamination par des matières fécales. *Staphylococcus aureus* indique une contamination humaine (mains sales, infection pour le nez, la peau ou la gorge). *Salmonella* est rarement présente dans les produits de la pêche et indique un défaut d'hygiène. Tous ces groupes bactériens permettent de détecter une déficience de l'application des bonnes pratiques d'élevage et de la fabrication. Pour les bactéries anaérobies sulfitoréductrices à 46°C, la recherche de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum* peut être effectuée car celles-ci ont été impliquées dans des TIAC dus à des produits de la pêche. Le groupe II avec toxine E de *Clostridium botulinum* est spécifique [17].

Pour les *Vibrio*, il existe 51 espèces dont 12 pathogènes pour l'homme. Les espèces les plus fréquemment isolées sont les vibrions cholériques sérogroupes O1 et O139 et les vibrions non cholériques de sérogroupes non O1 et non O139 et *V. parahaemolyticus*. *V. choléra* O1 et O139 sont les seuls agents à causer le choléra en épidémie ou de façon sporadique. Les vibrions non cholériques de sérogroupes non O1 et non O139 causent habituellement une forme douce de gastroentérites et sont normalement associés à des cas sporadiques ou à de petites épidémies.

La première source pour *V. choléra* O1 et O139 sont les fèces des personnes infectées. Elle est retrouvée dans l'eau et une forte association est faite entre le niveau du zooplacton et le taux de *V. choléra*. La période d'incubation est de quelques heures (moy 48h) à quelques jours (1-3j max 6j). Les symptômes sont la diarrhée avec une déshydratation aiguë, sans fièvre. C'est une maladie asymptomatique (90% des cas) avec élimination des bactéries dans les selles pendant 5-10 jours qui peut passer de la maladie de la diarrhée banale (10%) au choléra sévère (1%). C'est une maladie spontanément résolutive sauf déshydratation ou choc du patient avant son rétablissement. Le vibrion cholérique peut survivre 2 à 14j à 5-10°C plutôt dans un aliment cuit que cru [18].

V. parahaemolyticus se trouve dans les estuaires et les eaux côtières du monde entier. Il est fréquemment présent dans les sédiments, le plancton, les poissons, les crustacés et les mollusques bivalves, en particulier les huîtres. La température et la salinité de l'eau jouent un rôle important pour la croissance de *V. parahaemolyticus*. Les hémolysines TDH et/ou TRH contribuent à la toxico-infection mais seulement si celles-ci sont produites dans le tube digestif. Exceptionnellement, *V. parahaemolyticus* provoque chez l'Homme des septicémies chez des sujets immunodéprimés ou atteints de maladies sous-jacentes des poissons [17]. Le tableau 2.2 regroupe les principales maladies rencontrées en aquaculture marine dans le monde [18].

Tableau 2. 2 : Principales maladies rencontrées en aquaculture marine dans le monde [18]

Agents pathogènes	Hôtes	Maladies	Environnement
Virus			
<i>Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse</i>	<i>Saumon atlantique, saumon du Pacifique, truite arc-en-ciel</i>	<i>Nécrose hématopoïétique infectieuse</i>	<i>Partie occidentale de l'Amérique du Nord, Japon, Europe, eaux douces, eau de mer</i>
<i>Virus de la septicémie hémorragique virale</i>	<i>Truite arc-en-ciel, turbot, truite d'Europe, ombre, corégone, brochet, morue, hareng, saumon du Pacifique</i>	<i>Septicémie hémorragique virale</i>	<i>Europe, côte pacifique des États-Unis et du Canada, eaux douces, eau de mer</i>
<i>Virus de la nécrose nerveuse virale</i>	<i>Bar, flétan, turbot, "Japanese parrotfish", "rock porgy", "tiger puffer", carangue australienne, serran des algues, "redspotted grouper", "Japanese flounder"</i>	<i>Encéphalopathie et rétinopathie virale (nécrose nerveuse virale)</i>	<i>Europe, Japon, Australie, eau de mer</i>
Bactéries			
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Nombreuses espèces de poissons</i>	<i>Vibriose</i>	<i>Monde entier, eaux saumâtres, eau de mer</i>
<i>Vibrio salmonicida</i>	<i>Saumon atlantique, morue</i>	<i>Vibriose des eaux froides</i>	<i>Europe, côte orientale de l'Amérique du Nord, eau de mer</i>
<i>Aeromonas salmonicida,</i>	<i>Salmonidés, turbot, "green flounder"</i>	<i>Furonculose</i>	<i>Large distribution, eaux douces, eau de mer</i>
<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>Sériole, bar, bar d'Amérique, dorade, tambour rouge</i>	<i>Pasteurellose</i>	<i>Eaux douces, eau de mer</i>
<i>Streptococcus spp</i>	<i>Nombreuses espèces de poissons</i>	<i>Streptococcose</i>	<i>Eaux douces, eau de mer</i>
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	<i>Salmonidés</i>	<i>Rénibactériose</i>	<i>Amérique du Nord, Europe, eaux douces, eau de mer</i>
<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>Nombreuses espèces de poissons</i>	<i>"Tuberculose" des poissons</i>	<i>Eaux douces, eau de mer</i>
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	<i>Saumon atlantique, saumon du Pacifique, truite arc-en-ciel</i>	<i>Piscirickettsiose</i>	<i>Côte pacifique des États - Unis, Europe, eaux douces, eau de mer</i>
Champignons			
<i>Ichthyophonus hoferi</i>	<i>Nombreuses espèces de poissons</i>	<i>Mycose viscérale</i>	<i>Eau de mer</i>
Parasites			
<i>Lepeophtheirus sp., Caligus sp.</i>	<i>Nombreuses espèces de poissons</i>	<i>Peau</i>	<i>Eau de mer</i>

Les maladies communément rencontrées chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) espèce étudiée dans cette recherche, sont montrées dans le tableau suivant :

Tableau 2.3 : Maladies du Bar (*Dicentrarchus labrax*) [9]

Maladie	Agent	Type	Syndrome	Mesure
Maladie Virale encephalo-retinopathie	Nodavirus	Virus	Symptômes de nervosité	Bonne prophylaxie; Bonnes conditions d'élevage
Vibriose	<i>Vibrio anguillarum</i> ; <i>Vibrio ordali</i> ; <i>Vibrio</i> spp	Bactérie	Anorexie; couleur foncée; ulcère de la peau; distension abdominale; splénomégalie; viscérale pétéchie; entérite nécrotique	Vaccination des juvéniles; antibiotique traitement
Photobactériose ou Pseudotuberculose	<i>Photobacterium damsela</i> subsp . <i>pasteurella</i>	Bactérie	Anorexie; assombrissement; splénomégalie; lésions de la rate ou granulomatoses de rate (forme chronique)	Antibiotique traitement
Myxobactériose	<i>Flexibacter maritimus</i>	Bactérie	Ulcère de la peau; nécrose; érosion des nageoires	Antibiotique traitement
Mycobactériose	<i>Mycobacterium marinum</i>	Bactérie	Emaciation; croissance faible; hypertrophie du rein et de la rate avec des granulomes	Bonne prophylaxie
Epitheliocystose	<i>Chlamydia</i> -like	Bactérie	Nodules sur la peau et branchies	Bonne prophylaxie
Amyloodiniase	<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Dinoflagellés	Peau foncée; apparence trouble de la peau (maladie de velvet)	Traitement avec l'eau douce
Cryptocaryoniase	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Ciliés	Lésions de peau; taches blanches ou taches blanches multifocales (maladie marine des taches blanches)	Traitement avec l'eau douce
Scuticociliatose; autres ciliatose	<i>Philasterides dicentrarchi</i> ; <i>Uronema</i> sp.; <i>Tetrahytnema</i> sp.	Ciliés	Lésions de peau et branchies; dépigmentation; ulcérations; hémorragies de certaines zones de la peau	Traitement avec l'eau douce
Myxosporidiose	<i>Shaerospora dicentrarchi</i> ; <i>S. testicularis</i> ; <i>Ceratomyxa labraci</i>	Myxosporidés	Réduction de la production; réduction du taux de croissance; faible mortalité	Pas de traitement
Microsporidiose	<i>Glugea</i> sp.	Microsporidés	Réduction de la production; faible mortalité	Pas de traitement
Infestation branchiale	<i>Diplectanum aequans</i> ; <i>D. laubieri</i>	Monogènes trématode	Peau trouble; rougeur localisée, avec production excessive de mucus hyperplasie épithéliale; hémorragie des branchies	Prophylaxie correcte; bonnes conditions d'élevage
Infection à Anisakis	<i>Anisakis</i> spp.	Nématode	Larve dans la cavité coelomique	Prophylaxie correcte
Atteinte par des Isopodes	<i>Ceratothoa oestroides</i> ; <i>Nerocilla orbigny</i> ; <i>Anilocra physoides</i>	Crustacés (isopodes)	Retard de croissance; nécrose des branchies et tissus de la peau; adultes et larve	Prophylaxie correcte

Le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) est l'une des espèces téléostéens cultivées en Algérie. Parmi les maladies bactériennes affectant cette espèce, la vibriose qui au stade précoce de la vie provoque une forte mortalité. La vibriose est l'une des maladies bactériennes les plus répandues chez les poissons, elle est causée par plusieurs genres de *Vibrio*, famille des Vibrionaceae [19]. Cette famille bactérienne se nourrit d'eau saumâtre et d'eau de mer chaude et est répandue dans les milieux côtiers marins et estuariens. En raison du réchauffement climatique, les Vibriospécies se sont également propagées à de nouveaux écosystèmes tempérés [20]. *Vibrio spp.* Sont dans beaucoup de cas des pathogènes facultatifs qui peuvent coloniser facilement des lésions externes ou, en tant que partie de la flore intestinale normale du poisson, déclenchent une infection, vraisemblablement lorsqu'un facteur de stress prédisposant génère une défaillance du mécanisme régulant la perméabilité intestinale postérieure. Pratiquement toutes les espèces de poissons marins et estuariens de tout âge sont sensibles. *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* et *V. ordalii* ont été associés à des mortalités chez les poissons d'élevage et les poissons sauvages dans les eaux tempérées et chaudes [19,21]. L'identification de l'espèce peut présenter quelques difficultés car la taxonomie des Vibrionaceae a subi de nombreuses révisions récentes. La vibriose du poisson se caractérise par une septicémie hémorragique systémique avec des signes cliniques qui sont : l'anémie, la léthargie, l'assombrissement de la peau, l'épaississement de la cornée, l'érythème de l'évent et la base des nageoires, des vaisseaux sanguins visqueux congestionnés et l'accumulation de liquide dans les intestins. En aquaculture, cette maladie est responsable de graves pertes économiques dans le monde entier. Cela est particulièrement important pour le loup de mer européen, une espèce très sensible aux facteurs de stress et aux agents pathogènes, où les infections peuvent parfois occasionner des pertes économiques importantes [20]

CHAPITRE 4

SYSTEME IMMUNITAIRE DES POISSONS OSSEUX

Le mode de vie aquatique des poissons impose certaines spécialisations anatomiques, notamment la peau, les branchies, et les organes sensoriels. La forte exposition de ces organes au milieu ambiant et à ses nombreux microbes implique des barrières renforcées, au premier rang des quelles on peut citer l'abondante production par la peau des poissons d'un mucus riche en molécules antimicrobiennes [22].

Les grandes catégories de cellules immunitaires des poissons sont proches de celles que l'on décrit chez les mammifères, au niveau morphologique comme fonctionnel.

On trouve l'équivalent des monocytes/macrophages, des polynucléaires neutrophiles, des polynucléaires éosinophiles, des mastocytes, des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules *natural killer* (NK). La présence de cellules dendritiques spécialisées dans la présentation de l'antigène reste encore à établir, de même que celle de cellules spécialisées dans la sécrétion d'interféron (IFN) [23].

Le poisson, comme tous les vertébrés, possède un système immunitaire inné qui compose la première ligne de défense contre un microorganisme externe et un système immunitaire acquis, spécifique d'un pathogène, avec une capacité de mémoire. La médiation du système immunitaire du poisson peut se faire par la voie cellulaire ou humorale. Comme chez les mammifères, les systèmes immunitaires innés et acquis sont complémentaires, le premier précède généralement le second. En effet, le système inné détermine la nature du système acquis et coopère avec ses acteurs tout au long de la réponse [6].

4.1. Système immunitaire non spécifique

La réponse non spécifique comprend des facteurs inhibiteurs de croissance (transferrine et anti protéases), des lysines (lysosymes), des peptides bactéricides mais surtout le système du complément. La synthèse de la transferrine a lieu

essentiellement dans les hépatocytes, les macrophages des organes lymphoïdes et accessoirement les lymphocytes [24].

4.2. Système immunitaire spécifique

Les anticorps constituent la réponse humorale spécifique produite par les lymphocytes du poisson. Ils peuvent inhiber l'adhérence et l'invasion des cellules non phagocytaires de l'hôte. Ils peuvent également activer le système du complément qui mène à la destruction de l'antigène. Ils jouent un rôle dans l'activation de l'inflammation qui se traduit par un signal envoyé aux cellules phagocytaires aptes à détruire l'antigène repéré. Le travail des macrophages peut également être favorisé par les lymphocytes T qui produisent des cytokines lorsqu'en présence d'un antigène qui leur est spécifique [24].

Seule la forme M (chaîne u) des immunoglobulines est présente chez les poissons téléostéens et ces dernières (IgM) sont toutes organisées en structures tétramériques à la différence des structures pentamériques des IgM des mammifères [25].

L'étude des immunoglobulines sériques du bar (*Dicentrarchus Labrax*) a été réalisée dans le cadre d'une thèse de doctorat [25]. Il s'agit de molécules de haut poids moléculaire (840 kD) présentant la structure tétramérique classique des IgM de poisson. Chaque monomère (210 kD) serait ainsi constitué de deux chaînes lourdes (chaînes H) de 77 kD et de deux chaînes légères (chaînes L) de 28 kD. La production d'anticorps monoclonaux (Acm) dirigés contre la chaîne H des IgM du bar a été également effectuée et nous permet de disposer d'Acm spécifiques [26].

4.3. Effet de l'environnement sur le système immunitaire du poisson

Les poissons sont liés à leur environnement, La température joue un rôle très important sur le système immunitaire des poissons. Certaines maladies ont une apparition saisonnière due à l'effet de la température sur le système immunitaire de l'hôte, mais aussi sur la pathogénicité et le développement du pathogène [27].

A basse température le système immunitaire non spécifique, les macrophages, et en général les phagocytes montrent une incapacité à tuer les bactéries ingérées.

En ce qui concerne la réponse humorale, elle est retardée ou supprimée. La réponse cellulaire est aussi inhibée. Les lymphocytes T offrent moins de récepteurs à leurs mitogènes spécifiques.

La qualité d'oxygène dissous dans l'eau peut aussi avoir des conséquences sur la réponse immunitaire. Les phagocytes et en général tous les leucocytes ont besoin de grande quantité d'oxygène pendant leur activation. En particulier les phagocytes, après leur stimulation, montrent une activation métabolique respiratoire qui aboutit à la formation de radicaux oxygénés libres, permettant leur action bactéricide.

Les différents polluants peuvent provoquer une diminution importante de l'oxygène disponible [27].

Les polluants n'agissent pas sur le système immunitaire seulement en diminuant la teneur de l'oxygène dans l'eau. Ils ont aussi des effets immunosuppresseurs directs en rendant les poissons plus fragiles aux pathogènes.

Des conditions d'environnement stressantes peuvent aussi favoriser le développement des maladies. Ces conditions sont par exemple les changements brusques de la température de l'eau, ou de la teneur en oxygène, les polluants mais aussi les manipulations et le transport. Tous ces facteurs défavorables stimulent l'axe neuro-hormonal en aboutissant à la sécrétion de catécholamines et de corticostéroïdes qui entraînent une immunosuppression chez le poisson [27].

CHAPITRE 5

LES MODIFICATION POST- MORTEM DU POISSON

5.1. Microbiologie du poisson vivant

Les micro-organismes sont présents sur les surfaces externes (peau et branchies) et les intestins. Le muscle du poisson vivant ou fraîchement capturé est pratiquement stérile. La charge microbienne est très variable, elle dépend de la température de l'eau, de sa salinité, du niveau de pollution, mais aussi de l'espèce. Elle est de l'ordre de 10^2 à 10^7 germes/cm² de peau et de 10^3 à 10^9 germes par gramme de branchies ou d'intestins [28]. Les mêmes types de bactéries hétérotrophes sont isolées de poissons pêchés dans différentes régions du monde, avec cependant des différences très marquées dans les niveaux de contamination, la composition générique et les caractères physiologiques des espèces isolées.

La flore de surface du poisson fraîchement capturé dans les eaux tempérées est dominée par des bactéries psychotrophes en bâtonnet, Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Sarcina*, *Proteus*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Lactobacillus*, *Alcaligenes* [29].

L'existence à la surface des poissons de germes potentiellement pathogènes tels que *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, est directement liée à leur présence dans les eaux ou les sédiments (bactéries indigènes). *Salmonella spp.*, *E coli*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* peuvent contaminer le poisson lors des manipulations de la capture à la consommation (bactéries non-indigènes). La flore intestinale normale est composée de : *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Moraxella/Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, et en faible nombre des bactéries à coloration de Gram positive dont *Clostridium sp.* Les bactéries à coloration de gram positive sont plus fréquemment isolées, dans les régions tropicales : il s'agit de *Micrococcus*, *Bacillus* et des *Corynéformes*. La flore microbienne du poisson va considérablement évoluer après la capture de l'animal et ce de façon variable selon l'espèce de poisson, son mode de capture, de traitement et de conservation [29].

5.2. Changements organoleptiques post-mortem

Les changements organoleptiques sont perçus par les sens, il s'agit de modifications de l'odeur, de l'apparence, de la texture et du goût.

Immédiatement après la mort, les muscles sont totalement relaxés, le poisson est mou et souple, et la texture est élastique au toucher. Ensuite, le tissu musculaire se contracte, se durcit. Quand le corps entier se raidit le poisson a atteint le stade de rigidité cadavérique. Cet état dépassé, le muscle se détend de nouveau, retrouve une souplesse et une texture proche de celle qui suit la mort. Avec de l'expérience il est possible de savoir si le muscle est en prés ou en post rigidité cadavérique. Dans le premier cas le poisson est souple, soumise à une légère pression, sa chair n'en conserve aucune trace. Les mécanismes ainsi que les différentes étapes de la rigidité cadavérique seront développés plus loin. En général les mauvaises odeurs se manifestent d'abord au niveau de la cavité abdominale [30].

La notion d'altération ne répond pas à une description objective. Ce pendant il existe des signes manifestes d'altération :

- Détection d'odeurs et de saveurs désagréables
- Formation d'une couche poisseuse
- Production de gaz
- Coloration anormale
- Changement de texture

L'apparition de ces signes d'altération est due à la combinaison de phénomènes microbiologiques, chimiques, physiques et autolytiques comme le montre le tableau suivant :

Tableau 5.1 : Causes d'altération du poisson, en fonction du type de changement observé [31].

Signes d'altération	Microbiologiques	Chimiques (oxydation)	Autolytiques	Physiques
Odeurs/saveurs anormales	+	+	+	-
Formation d'une couche poisseuse	+	-	-	-
Formation de gaz	+	-	-	-
Changements de couleurs	+	+	+	+
Changements de texture	+	-	+	+

Même si les réactions d'autolyse initient l'altération du poisson, les micro-organismes sont responsables des principales modifications organoleptiques conduisant à rendre le poisson impropre à la consommation.

5.3. L'invasion microbienne

Après une phase de latence dont la durée dépend de la température, les bactéries se multiplient rapidement pour atteindre en condition aérobie des taux de l'ordre de $10^8 - 10^9$ germes par gramme de chair ou cm^2 de peau lorsque l'altération devient détectable.

A basse température (température de réfrigération), cette croissance microbienne s'accompagne d'une modification qualitative qui se manifeste par une prédominance de germes : *Pseudomonas* et *Alteromonas* et ce quelle que soit la nature des espèces initialement présentes. Les germes appartenant aux genres *Moraxella/Acinetobacter* et *Flvobacterium* persistent mais en proportion décroissante au cours du stockage. La prédominance des *Pseudomonas* s'explique par leur aptitude à croître rapidement aux températures de réfrigération (temps de génération de l'ordre de 10 à 20 heures à 0°C) [32]

Les microorganismes se rencontrent sur la peau, les intestins et les branchies. On estimait auparavant, que les bactéries envahissaient le muscle à travers le système vasculaire ou la peau. Cependant, l'examen de coupes histologiques a montré que pour le poisson réfrigéré, seule une faible quantité de bactéries envahit le muscle et ce pendant les dernières étapes de l'altération, la principale activité microbienne a lieu à la surface où les composés de faible poids moléculaire sont dégradés. Les enzymes microbiennes passent de la surface au muscle, alors que les substrats tissulaires migrent vers l'extérieur [32].

Des différences au niveau du tégument et du mucus de diverses espèces de poisson constituent un facteur de variation de la vitesse d'altération. Le merlan (*Merlangius merlangius*) qui possède un tégument fragile et facilement détérioré pendant la manutention, s'altère rapidement, alors que la plie (*Pleuronectes platessa*), dotée d'un épiderme robuste recouvert d'un mucus riche en lysozyme, s'altère lentement [33].

La température de stockage, la quantité d'oxygène disponible sont les principaux facteurs influençant la vitesse d'altération. Selon les conditions de conservation une ou plusieurs espèces de bactéries sont principalement responsables des phénomènes d'altération, on parle d'organisme spécifique d'altération (SSO pour specific spoilage organism). Pour le poisson conservé sous glace l'organisme majoritairement responsable des phénomènes d'altération est *Shewanella putrefasciens* et pour le poisson frais conservé sous vide on incrimine *Photobactérium phosphoreum*. Par contre à température ambiante élevée, le poisson s'altère plus rapidement, les *Vibrionaceae* et *enterobacteriaceae* produisent des métabolites responsables des odeurs et des saveurs désagréables[34].

5.4. Le poisson substrat pour les bactéries

Le poisson est un très bon substrat pour la croissance bactérienne. Le poisson frais contient une proportion importante en eau. Il est riche en azote non protéique comme l'O.T.M.A. les glucides étant présents en faible proportion, une faible quantité d'acide lactique s'accumule après la mort. Cette acidification peu marquée (pH ultime de 6,5-6,8) permet une multiplication microbienne précoce. Le substrat le plus important pour l'activité métabolique des bactéries est la fraction hydrosoluble incluant l'O.T.M.A., les acides aminés libres et les nucléotides (I.M.P. et inosine). A partir de ces substrats, les bactéries produisent une série de composés volatils participant à l'altération comme le T.M.A, des composés sulfurés, de l'ammoniac, des aldéhydes et des cétones [35]

5.5. Réduction de l'O.T.M.A. en T.M.A

L'oxydation par les microorganismes aérobies génère beaucoup plus d'énergie que la fermentation aérobie. Ce sont les bactéries aérobies qui se multiplient initialement, en utilisant les hydrates de carbone et le lactate comme source d'énergie et l'oxygène comme accepteur final d'hydrogène, les produits terminaux étant CO₂ et H₂O. La croissance de ces organismes aérobies crée des micro-régions anaérobies à la surface du poisson, favorisant la croissance de des bactéries aérobie-anaérobie facultatives [35].

La présence de l'O.T.M.A. permet aux bactéries capables de réduire ce composé, de se développer, y compris en anaérobiose. L'oxyde de triméthylamine n'est pas utilisé comme substrat pour les bactéries, mais comme accepteur final d'électrons. Il est indispensable pour la croissance rapide des bactéries quand l'oxygène se raréfie, la réduction de ce composé libère du T.M.A. jouant un rôle dans l'odeur du poisson en lui conférant une saveur spécifique. Cette réaction nécessite également l'utilisation d'acides aminés libres ou de lactate [36].

Plusieurs bactéries à Gram négatif se développant dans le poisson, comme *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas spp.* Et des Entérobactéries, sont capables d'utiliser l'O.T.M.A. comme accepteur final d'électrons [37,38].

La T.M.A. possède une odeur désagréable caractéristique au-dessus du seuil de rejet, elle est le constituant principal de ce que l'on appelle « L'Azote Basique Volatile Total » (A.B.V.T).

L'ammoniac est également un élément de l'A.B.V.T. Il se forme plus tardivement, lors du processus d'altération, suite à la désamination des acides aminés par les bactéries (une petite partie est produite par autolyse). Chez les Elasmobranches il s'accumule en quantités importantes. En effet la chair de ces poissons est riche en urée, qui se décompose en dioxyde de carbone et ammoniac [34] :

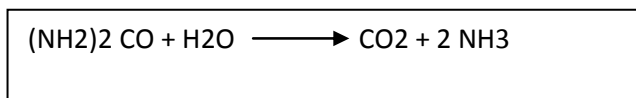


Figure 5.1 : Dégradation de l'urée sous l'action d'uréases bactérienne [34].

5.6. Dégradation des acides aminés

La majorité des odeurs dégagées lors de l'altération du poisson est le produit de la dégradation des acides aminés. La dégradation bactérienne des acides aminés soufrés conduit à la formation de sulfure d'hydrogène (H₂S), de méthyl mercaptan (CH₃SH) à partir de la cystéine et de diméthyl sulfure ((CH₃)₂S) à partir de la méthionine. Ils confèrent au poisson une odeur fétide et sont perceptibles à des niveaux de concentration très faibles, compromettant ainsi fortement la qualité. Ces odeurs sont essentiellement produites par des *Pseudomonas* type putefaciens et occasionnellement par *P.fluorescens* et *P.fragi*.

Pseudomonas spp. est capable de produire également différents aldéhydes, cétones et ethylesters. Ces derniers sont responsables des odeurs fruitées et sont des composés caractéristiques de la dégradation des acides aminés [39].

La dégradation des acides aminés est également responsable de la formation d'amines comme la cadavérine, la putrescine et l'histamine, dérivant respectivement de la lysine, l'arginine et l'histidine.

L'histamine se forme après la mort par décarboxylation bactérienne de l'histidine. Les espèces les plus fréquemment incriminées sont celles présentant une teneur élevée en histidine, comme les scombridés (thon, maquereaux) et les clupéidés. Les bactéries responsables de la production de l'histamine sont certaines *Enterobacteriaceae*, un certain nombre de *Vibrio spp.* et un petit nombre de *Clostridium* et de *Lactobacillus spp* [35].

Les producteurs les plus puissants sont *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Hafnia alvei*, ces bactéries sont présentes chez la plupart des poissons, suite à une contamination après la capture. Elles se multiplient à 10°C, mais à 5°C, la croissance est considérablement retardée. Pour certains auteurs la capacité à produire de l'histamine est inhibée à des températures inférieures [40], tandis qu'elle est encore possible pour d'autres [41].

Il convient de signaler qu'une fois l'histamine produite dans le poisson, le risque de maladie est considérable, l'histamine étant résistante à l'appertisation. Les symptômes apparaissent rapidement après consommation. Ils sont dus à l'effet vasodilatateur de l'histamine (rougeur, œdème, urticaire, etc.) et disparaissent spontanément en quelques heures. Même si des concentrations élevées en histamine dans les échantillons incriminés sont retrouvées lors de poussées épidémiques de symptômes cohérents avec une étiologie d'origine histaminique, la maladie n'est pas forcément reproductible par ingestion de poisson contenant une concentration équivalente en histamine. L'organisme humain peut très bien tolérer une certaine quantité d'histamine sans effets indésirables. L'histamine ingérée est détoxifiée lors du transit par au moins deux enzymes, la diamine oxydase (D.A.O) et l'histamine N-méthyltransférase [42]. Ce mécanisme peut cependant être défaillant si l'ingestion d'histamine et /ou d'autres amines biogènes (cadavérine, putrescine) est extrêmement élevée ou si l'action est bloquée par d'autres composés comme l'alcool ou certains médicaments [43].

Des composés aromatiques et N-cycliques sont formés à partir de phénylalanine, tyrosine et tryptophane. De même la valine, la leucine et l'isoleucine sont des précurseurs d'alcools et de carbonyles à courtes chaînes. Tous ces métabolites sont à l'origine d'odeurs désagréables contribuant à l'altération de la chair de poisson [43].

5.7. Dégradation des protéines

Les bactéries impliquées dans l'altération post-mortem libèrent de nombreuses protéases. Ces enzymes participent à la perte de fermeté de la chair de poisson, notamment par la lyse des protéines du tissu de connexion et des protéines myofibrillaires. Dans les stades précoces de l'altération, les protéases bactériennes sont réprimées par la forte concentration en acides aminés libres. Dans les stades avancés, les acides aminés ayant été utilisés, les protéases sont déréprimées et reconstituent le pool d'acides aminés [44].

5.8. Dégradation des nucléotides

L'hypoxanthine, qui est responsable d'odeurs amères lors de son accumulation dans le poisson, est le produit de la dégradation de l'ATP et de ces dérivés. Les enzymes bactériennes poursuivent la dégradation commencée par voie autolytique. L'inosine et l'I.M.P. sont transformés en hypoxanthine dont la teneur augmente au cours de la conservation [44].

5.9. Dégradation des lipides

Les acides gras sont également utilisés par les bactéries. Les produits de ces réactions sont à l'origine de cétones et d'aldéhydes à courtes chaînes conférant à la chair de poisson une odeur désagréable [44].

CHAPITRE 6

LES METHODES D'APPRECIATION DE LA QUALITE DU POISSON FRAIS

Plusieurs méthodes ont été développées afin d'évaluer l'état de fraîcheur des produits de pêche et d'aquaculture et de détecter la présence de substances ou organismes potentiellement dangereux dans ces produits

6.1. Méthodes organoleptiques

Lors de la première partie nous avons évoqué les changements organoleptiques du poisson après sa capture. L'analyse de ces changements est à l'origine de méthodes permettant d'apprécier la fraîcheur du poisson. La rapidité de réponse et la bonne corrélation de l'état de fraîcheur avec la qualité globale du produit font de ces méthodes des outils indispensables aux professionnels de la filière, notamment pour les produits frais.

Ce type d'examen fait donc appel aux perceptions sensorielles (vue, odorat, toucher et goût) de l'observateur qui appréciera des caractères prédéfinis (couleur des yeux, des branchies).

Les critères choisis doivent être modifiés de façon significative par les phénomènes d'altération. A chaque caractère sont associés des descripteurs, également prédéfinis, variant selon l'état de fraîcheur ressenti (odeur : douce, légère, puis neutre, puis nauséabonde).

A chaque descripteur correspond une note ou une catégorie, le produit est évalué en estimant tous les caractères.

Lorsque la moyenne arithmétique des notes attribuées pour chaque caractère est définie pour déterminer un indice soit de fraîcheur, soit d'altération du produit, on parle de « Méthode organoleptique chiffrée ». Nous décrirons les principales méthodes organoleptiques utilisées pour évaluer la fraîcheur du poisson frais.

6.1.1. Description des caractères d'altération

Le tableau 6.1. regroupe les principaux caractères organoleptiques du poisson frais et du poisson avarié. Dans la pratique, l'état de fraîcheur se situe généralement entre ces deux extrêmes.

Tableau 6.1 : Description des caractères d'altération chez les téléostéens [45].

	Poisson frais	Poisson altéré
Odeur	Légère, agréable. Rappelant l'algue Marine pour les poissons de mer ou Les herbes aquatiques pour les poissons d'eau douce	Désagréable, âcre, acide, ammoniacale, putride.
Aspect général	Brillant, avec éclat métallique et reflets irisés	Mat, sans éclat ni reflets
Rigidité du corps	Corps rigide, arqué. Consistance ferme et en même temps élastique.	Corps flasque, mou. Consistance molle, la pression des doigts laisse des marques
Sécrétions	Poisson humide. Mucus transparent, pas de sécrétions visibles.	Présentes et gluantes.
Ecailles	Fortement adhérentes, brillantes.	Soulevées, se détachent facilement.
Peau	Tendue, bien colorée, bien adhérente.	Ridée, décolorée, facilement déchirable.
Oeil	Clair, vif, brillant, luisant, convexe, transparent, occupant toute la cavité Orbitaire.	Terne, vitreux, opalin, opaque, Concave, affaissé dans l'orbite.
Opercule	Adhérent, sans taches.	Légèrement soulevé, avec des taches rouge brun.
Branchies	Humides, brillantes, roses ou rouge sang.	Sèches, grisâtres ou plombées
Abdomen	Forme normale (ni gonflé, ni affaissé, ni tendu, ni déchiré). Pas de taches.	Flasque, déformé, souvent gonflé, avec des taches colorées (bleu foncé, verdâtre ou noirâtre).
Anus	Hermétiquement fermé.	Béant, souvent proéminent.
Viscères	Lisses, propres, brillants, nacrés. Péritoine adhérent à la paroi de la cavité viscérale.	Affaissés, gonflés. Péritoine fragile.
Côte et colonne vertébrale	Adhérentes et faisant corps avec la paroi thoracique et les muscles du dos.	Soulevées, faciles à détacher sans emporter de lambeaux de muscle.
Chair	Ferme, blanche ou rose, rarement rouge (thon). Reflets en surface et à la coupe	Friable, coloration rouge ou plus ou moins brune, notamment le long de la colonne vertébrale.

6.1.2. Barème de cotation de fraîcheur européen

Afin d'améliorer la qualité sanitaire des produits de la pêche, d'en faciliter l'écoulement, de prévenir des distorsions de concurrence et d'uniformiser les règles d'application du régime des prix de l'organisation commune des marchés, un règlement communautaire (règlement, CEE n°2406/96) propose pour les principales espèces pêchées, un barème de cotation harmonisé permettant le classement des produits par lot de catégories de fraîcheur identique. Par ordre de fraîcheur décroissante, on distingue les catégories Extra, A ou B. Les poissons non classés dans une de ces trois catégories sont considérés comme « non admis » et ne peuvent être commercialisés pour la consommation humaine [46].

Ce règlement s'applique à tous les produits lors de la première mise en vente. Le classement de fraîcheur est sous la responsabilité des professionnels. Les services vétérinaires ont pour mission d'effectuer un contrôle de deuxième niveau de ce classement et de vérifier, par sondage, que les produits proposés à la vente sont salubres.

Chaque lot doit être homogène quand à son état de fraîcheur et impose d'examiner les critères sur un nombre représentatif d'unité de ce lot, choisi au hasard dans l'ensemble du lot. Si un lot n'est pas homogène, il est classé dans la catégorie de fraîcheur la plus basse qui y est représentée [46].

Cette méthode se présente comme un test descriptif utilisant des descripteurs prédéfinis, elle est semi-quantitative puisqu'elle permet un classement dans une catégorie.

Les critères observés sont la peau, les yeux, les branchies et la chair, l'examineur devra apprécier les couleurs, les odeurs, la consistance et classer le produit dans une des 4 catégories selon la correspondance entre ses observations et les descripteurs retenus dans la grille d'évaluation.

Cette méthode ne s'applique cependant qu'au poisson entier et ne tient compte, dans sa conception, des différences entre les espèces, les descripteurs étant presque communs à tous les poissons conservés sous glace. Elle ne permet pas non plus d'estimer la durée de vie restante.

La classification dans les différentes catégories de fraîcheur n'est pas toujours aisée. Un poisson peut en effet présenter des caractères décrits dans 2 ou 3 catégories. L'attribution de la catégorie exige donc une grande expérience du personnel qui en a la charge, les différences de vitesse d'altération ainsi que les changements organoleptiques propres aux différentes espèces devant être pris en compte dans l'attribution finale de la catégorie [34].

6.1.3. La méthode de l'indice de qualité

La méthode de l'indice de qualité (QIM en anglais, pour Quality Index Method) est une méthode imaginée par l'institut de recherche des aliments de Tasmanie, puis développée dans les pays nordiques, dans certains pays de la communauté européenne, notamment au Danemark à l'institut de recherche pour les produits de la pêche. Comme la méthode chiffrée française, elle utilise des caractères sensoriels significatifs (odeur, texture, état de l'œil, etc.) auxquels sont attribués des descripteurs et une note variant de 0 à 4. Le score final est l'addition des scores obtenus pour chacun des caractères analysés, on l'appelle index de qualité. Cet index varie de 0 pour le poisson très frais à une valeur d'autant plus élevée que le poisson est altéré. Chacun des caractères observés n'influence que partiellement le résultat final. A la différence de la méthode chiffrée française, les caractères observés ainsi que les descripteurs sont différents d'une espèce à l'autre. De plus, pour le poisson frais entier, cette méthode permet de prévoir la durée de vie restante du produit [47].

Les méthodes organoleptiques restent très utilisées à tous les niveaux de la filière pour l'évaluation de la qualité des produits. La rapidité, le faible coût, la non destruction des produits évalués sont les principaux atouts de ces méthodes. Le développement récent de nouveaux protocoles est la preuve de l'intérêt persistant pour ces méthodes [34, 35].

Cependant, l'examen organoleptique reste subjectif et nécessite un bon savoir faire du personnel qui l'utilise. De plus, ce type d'examen ne permet pas de détecter la présence de certaines substances (amines biogènes, toxiques, toxines) ou de

certaines agents pathogènes (virus, bactéries, parasites). Ces carences ont conduit les professionnels et chercheurs de la filière à développer d'autres méthodes permettant d'apprécier la qualité du poisson [34,35].

6.2. Méthodes utilisant le dosage de composés chimiques

Les phénomènes d'autolyse et les réactions métaboliques des bactéries en multiplication modifient considérablement les concentrations de certains composés de la chair du poisson. Les composés utilisés comme substrat dans ces réactions voient leur concentration diminuer et les métabolites qui en résultent s'accumulent s'ils ne sont pas réutilisés. Divers composés ont été proposés comme indicateurs de fraîcheur ou d'altération. De plus, de nombreuses techniques ont été développées pour un même composé [48, 49].

Les amines volatiles sont responsables de l'odeur et la flaveur caractéristiques du poisson. La concentration plus ou moins importante du poisson en amines volatiles a des conséquences sur l'appréciation du produit par les consommateurs. Ces amines sont présentes dans les poissons de mer à des niveaux très faibles juste après la capture. Leur concentration varie ensuite suivant les espèces, la température, le temps de conservation et d'autres facteurs. Ces amines sont les constituant les plus caractéristiques et les plus importants de l'azote non protéique. Il s'agit de l'ammoniac, du diméthylamine (DMA), du triméthylamine (TMA), et de l'oxyde de triméthylamine (OTMA) qui est la source principale de DMA et TMA. L'azote basique volatil total (ABVT) est un mélange d'ammoniac, de DMA et TMA [34, 48].

6.2.1. Evolution de la concentration des différentes amines volatiles durant le stockage sous glace :

Lors du stockage sous glace, on constate une augmentation des concentrations en DMA, TMA et ABVT, et une diminution de la concentration en OTMA. Des études menées sur différentes espèces conservées sous glace pendant 4 semaines ont permis de connaître l'évolution dans le temps de la concentration des différents constituants [50].

- **Ammoniac :**

Dans les premiers jours de stockage, l'ammoniac contenu dans les poissons de mer conservés sous glace reste à une concentration relativement voisine de celle du poisson vivant. Chez les poissons de petite taille, on constate une diminution de la concentration pendant cette phase. La concentration augmente ensuite (entre le septième et le douzième jour) et se poursuit toute la durée du stockage, la concentration finale étant très variable d'une espèce à l'autre. L'ammoniac est donc un mauvais indicateur de l'état de fraîcheur, c'est simplement un indicateur d'une altération avancée [34, 51].

- **Diméthylamine :**

L'évolution de la concentration en DMA est différente pour les poissons qui synthétisent la OTMAase (cette enzyme permet la transformation de l'OTMA en DMA et formaldéhyde) de ceux qui en sont incapables. Chez les poissons qui possèdent cette enzyme (haddock, merlan) on observe durant la première semaine une augmentation incessante de la concentration avec des valeurs comprises entre 4 et 7mg de DMA pour 100g. On constate un arrêt soudain de cette augmentation après une semaine environ. La concentration en DMA oscille autour de 6mg/100g les jours suivants et pendant toute la durée du stockage. L'inhibition par l'oxygène de l'enzyme OTMAase est à l'origine de cet arrêt brutal de l'accumulation de DMA [34, 35].

Après la première phase de stockage, l'oxygène peut diffuser au sein du muscle de poisson du fait des modifications de sa structure consécutive aux phénomènes autolytiques et à l'altération bactérienne. De plus les bactéries transforment l'OTMA en TMA ce qui inhibe également l'action de l'OTMAase endogène. Chez ces espèces le DMA est un très bon indicateur de fraîcheur pendant la première semaine de stockage [34].

- **Triméthylamine :**

Comme l'ammoniac, le TMA conserve une concentration relativement stable pendant une dizaine de jours. Ensuite, sous l'effet de l'activité microbienne la concentration en TMA augmente pendant toute la durée du stockage. Le TMA qui est produit chez toutes les espèces de poisson est un excellent indicateur de

l'altération bactérienne. Par contre il n'apporte aucune information les 10 premiers jours de conservation sous glace [35]

- **Azote basique volatil total :**

Durant la première semaine de stockage sous glace, le taux d'ABVT reste proche de celui du poisson vivant et on constate même parfois une légère diminution.

La concentration augmente ensuite constamment pour atteindre des valeurs comprises entre 25 et 50mg/100g lorsque le poisson devient impropre à la consommation.

La mesure de la concentration est d'usage plus restreint chez les poissons gras. En effet chez certaines espèces, on ne peut mesurer que de faibles variations de la concentration durant toute la période de stockage.

L'ABVT comme le TMA est un bon indicateur de l'altération du poisson, mais il ne peut pas être utilisé comme un indicateur de fraîcheur [34,51].

- **Oxyde de triméthylamine :**

L'OTMA est la seule amine dont la concentration décroît durant le stockage sous glace. Cette diminution de la concentration en fonction de la durée de stockage est presque linéaire.

L'OTMA est donc un bon indicateur de l'état de fraîcheur et du niveau d'altération. Cependant il faut absolument connaître, pour utiliser ce paramètre, la concentration initiale en OTMA qui varie considérablement d'une espèce à l'autre. Cet indicateur est donc réservé à des espèces dont les caractéristiques sont bien connues [34,35].

6.2.2. pH

Le pH est un paramètre important qui montre la diminution de la qualité de la chair durant le stockage.

Le pH post mortem varie de 5.5 à 7.1 suivant la saison, les espèces et d'autres facteurs. Un pH faible est utilisé comme un indicateur de stress au moment de l'abattage de beaucoup de poissons. Un pH initial faible est associé avec une augmentation de stress à l'abattage, c'est causé par la diminution des réserves des réserves énergétiques, principalement le glycogène, avec la production de lactate. Puisque l'activité des enzymes dépend du pH, il affecte les réactions qui se déroulent pendant le stockage du poisson.

Un pH relativement faible peut entraîner une diminution des liaisons d'eau dans les myofibrilles, affectant l'apparence du poisson. Un pH faible favorise aussi l'oxydation des myoglobines et des lipides [52].

6.2.3. Dosage des amines biogènes

Les amines biogènes sont définies comme des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central et sur le système vasculaire. Le poisson peut contenir de l'histamine, de la cadavérine, de la putrescine, de la spermine, de la spermidine, de la méthylamine de la tryptamine. Toutes ces amines proviennent de la décarboxylation bactérienne des acides aminés. L'ingestion de ces amines peut entraîner des symptômes voisins de ceux d'une intoxication microbienne [52].

Le contrôle de la teneur en histamine est rendu obligatoire par la directive 91/493 CEE pour les espèces (Scrombidés, Clupéidés, Engraulidés, Coryphaenidés) les plus fréquemment impliquées dans les cas d'intoxication à l'histamine [53].

- **Amines biogènes et indices de fraîcheur :**

La mesure des concentrations en amines biologiques peut également être utilisée comme indicateur de l'altération du poisson.

La mesure des concentrations des différentes amines est généralement mesurée par méthodes chromatographiques.

Une correspondance a pu être établie entre la valeur de l'index et des résultats obtenus par des méthodes sensorielles. Ces méthodes ne sont pas utilisées en routine, mais l'amine index (figure 6.1.) est un bon indicateur de la fraîcheur et de l'altération [54].

$$\begin{array}{l}
 \text{AI} = \frac{\frac{\text{NH}_4^+}{1000} + \text{Put.} + \text{Cad.} + \text{His.} + \text{Tyr} + \text{Tryp.}}{\frac{\text{NH}_4^+}{1000} + \text{Put.} + \text{Cad.} + \text{His.} + \text{Tyr} + \text{Tryp.} + \text{Met.} + \text{Spd.} + \text{Spm}} \times 100 \\
 \text{AI} = \frac{\text{Put.} + \text{Cad.} + \text{His.}}{\text{Put.} + \text{Cad.} + \text{His.} + \text{Tyr} + \text{Tryp.} + \text{Met.} + \text{Spd.} + \text{Spm}} \times 100
 \end{array}$$

Figure 6.1 : Indices d'altérations utilisant les concentrations en amines biogènes [54]

- **Dosage de l'histamine :**

L'histamine est une amine aromatique thermostable (elle n'est donc pas détruite par la chaleur), issue de la **décarboxylation de l'histidine**, essentiellement par voie bactérienne (figure 6.2) et responsable de l'intoxication dite « histaminique ». On trouve l'histidine dans les pigments (hémoglobine, myoglobine.....). Le respect des conditions d'hygiène et de la chaîne du froid constitue les seuls moyens de maîtrise efficaces du risque histaminique [55].

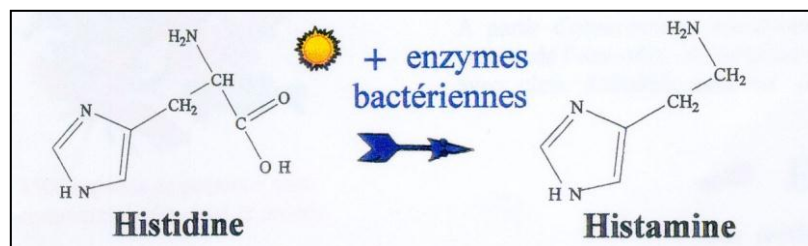


Figure 6.2 : Décarboxylation de l'histidine [56].

6.2.4. Dosage des métabolites de l'ATP

Le contrôle de la dégradation de l'ATP est utilisé comme indicateur chimique de l'état de fraîcheur du poisson. En effet, les concentrations en ATP et en catabolites qui en résultent évoluent parallèlement avec la perte de fraîcheur perçue par l'analyse sensorielle. La dégradation de l'ATP coïncide avec cette perte de fraîcheur mais n'en est pas nécessairement responsable [52].

- **Le facteur K :**

La concentration totale de l'ATP et ses métabolites est relativement constante. Pour suivre le processus de dégradation de l'ATP, on utilise le facteur K, rapport entre les catabolites terminaux et l'ensemble des composés impliqués dans la chaîne de réaction.

$$K (\%) = \frac{[\text{INO}] + [\text{Hx}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{INO}] + [\text{Hx}]} \times 100$$

Les concentrations en inosine et hypoxanthine sont peu élevées dans le poisson juste après la mort, la valeur de K est donc faible. Au cours du stockage, l'ATP est

rapidement dégradé, l'inosine et l'hypoxanthine s'accumulent et la valeur de K augmente. Le facteur K est le reflet de changements autolytiques précoces ; il permet d'évaluer l'état de fraîcheur du poisson dès les premiers jours de stockage. Au cours du stockage sous glace, la valeur du facteur K évolue de façon linéaire chez la plupart des espèces [57]. Cependant la valeur initiale et finale du facteur K est variable selon l'espèce, le mode de capture, le sexe, le stade physiologique, la saison, le mode de mise à mort [58].

- **Mesure du facteur K :**

L'évaluation du facteur K nécessite la mesure de la concentration de six métabolites. Cette procédure étant un peu contraignante, il a été suggéré de ne pas toutes les utiliser. Comme l'ATP, l'ADP et l'AMP sont rapidement dégradées après la mort. Certains chercheurs ont simplifié la formule du facteur K en intégrant simplement l'IMP, l'inosine et l'hypoxanthine. Pour certaines espèces il y a une bonne corrélation entre le facteur K_1 et le facteur K [34].

$$K_1 = \frac{[\text{INO}] + [\text{Hx}]}{[\text{IMP}] + [\text{INO}] + [\text{Hx}]} \times 100$$

De nombreuses méthodes ont été développées pour mesurer K et K_1 . Les techniques utilisées peuvent être classées en deux catégories :

Les méthodes chromatographiques et les méthodes enzymatiques.

Parmi les méthodes chromatographiques, la méthode HPLC de Ryder est la plus couramment utilisée, elle permet une évaluation du facteur K en une heure, et sert de référence pour évaluer la pertinence des résultats obtenus par les autres méthodes.

Les méthodes enzymatiques permettent d'évaluer l'intensité de la réaction entre une enzyme et un métabolite, soit grâce à une électrode mesurant l'oxygène consommé lors de la réaction, soit grâce à un changement de coloration (Papier réactif permettant une évaluation semi-quantitative) [34,35].

6.2.5. Analyse des composés volatils

L'odeur est un des paramètres le plus important dans l'évaluation de la fraîcheur du poisson. Le poisson frais exhale un parfum délicat et caractéristique de l'espèce. Ces odeurs s'estompent ensuite et laissent place à des odeurs douceâtres, aigres ammoniacales et même putrides lorsque le poisson est altéré. Ce sont les composés volatils libérés du stockage qui sont à l'origine des odeurs perçues [52,59].

- **Intérêts de l'analyse des composés volatils :**

La perte de fraîcheur consécutive à l'altération du poisson met en jeu des réactions complexes, influencées par de nombreux paramètres. Ainsi, il a été suggéré qu'il n'existait pas un seul indicateur de la perte de fraîcheur mais plutôt une combinaison d'éléments permettant de rendre compte des multiples changements se produisant au sein de la chair de poisson [59].

Les composés volatils contribuant aux changements d'odeur peuvent être utilisés pour apprécier l'état de fraîcheur ou d'altération du poisson. En effet, l'étude des différents composés volatils retrouvés dans le poisson durant sa conservation sous glace a permis de mettre en évidence l'origine chimique des différentes odeurs perçues durant toute la durée de vie du produit [59].

Les composés volatils ont pu être classés en différentes catégories en fonction de l'impact de l'odeur qu'ils génèrent sur la qualité générale du produit (poisson très frais, poisson altéré), de leur origine (phénomènes d'autolyse, métabolisme des bactéries), de leur structure chimique (Tableau 6.2)

Tableau 6.2: Catégories d'odeur du poisson perceptibles lors de son stockage et exemples de composés impliqués dans la formation de ces odeurs [59].

Odeur	Classe chimique	Exemple de composé	Description de l'arôme	Seuil de détection	
Odeurs du poisson frais Caractéristiques de l'espèce	Alcools C ₆ -C ₉ carbonyles	Hexanal/ <i>t</i> -2-hexenal	Vert, d'aldéhyde	4,5ppb/17ppb	
		1-octen-3-ol,/1octen-3-one	champignon	10ppb/0,009ppb	
		1,5-octadiène-3-ol	terre grasse, champignon	10ppb	
		1,5-octadiène-3-one	géranium	0,001ppb	
		2,6-nonadienal	concombre	0,001ppb	
		3,6-nonadienol	concombre, melon	10ppb	
	Bromophénols	2,6-dibromophenol	lode, crevette	0,0005µg/kg	
		2,4,6-tribromophenol	d'eau de mer	0,6 µg/kg	
		2-bromophenol	Saveur marine		
	Composés azotés cycliques	Pyrrolidine Pipéridine	terre		
Odeurs issues de l'altération microbienne	Alcools et carbonyles à courte chaîne	Ethanol,propanol,butanol	solvant	1-100ppm	
		Acétone,butanone	solvant		
		3-méthylbutanal	malt	0,06ppm	
		2-méthylbutanal	malt	0,04ppm	
	Amines	Ammoniac	ammoniacale	110ppm	
		TMA	De poisson ammoniacal	30ppm	
		DMA		0,6ppm	
		Histamine,putrescine, cadavérine	Putride, pourri		
	Composés sulfurés	Hydrogène sulphide	Souffre,œufs pourri	5-40ppm	
		Méthylmercaptan	Pourri, chou	0,05ppm	
		Méthylsulphide	chou	0,9 µg/kg	
		Diméthyl disulfide	Putride,oignon	12ppm	
		Diméthyl trisulfide	Putride, chou	0,01ppm	
		Bis-méthylthiométhane	L'ail	0,3	
	Aromatiques	Alcool Phenethyl	Vielles roses		
		Phénol	Phénolique	2ppm	
		P-crésol	Fumier de cheval, Parc à cochons	300 µg/kg	
	Composés azotés cycliques	Indole	De naphtaline, fécale		
		Scatole			
	Acides	Acide acétique	Aigre, pourri Vieilles chaussettes	34ppm	
		Acide butyrique		33ppm	
		Acide iso butyrique			
	Odeurs provenant des phénomènes d'oxydation	Aldéhydes insaturés	Hexanal	Vert, de plante	4,5ppb
			C4-heptanal	De carton, de pomme de terre	0,04ppb
			2,4heptadienal	De poisson rancis	

- **Méthodes de mesure :**

Des méthodes chromatographiques permettent de mesurer la teneur des différents composés volatils. Ces méthodes sont destructrices pour les produits (extraction au préalable des différents composés), nécessitent des équipements de laboratoire et un personnel qualifié.

De telles techniques ne peuvent donc pas être utilisées en routine dans l'industrie. Cependant la nécessité grandissante de méthodes rapides permettant d'évaluer la teneur de certains composés volatils a conduit au développement d'un « nez électronique » [34,59].

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été conduites sur les différents types de capteurs de gaz électrochimiques et ont abouti à la commercialisation de capteurs permettant la détection de substances volatiles dans divers produits alimentaires.

Plusieurs appareils ou nez électroniques utilisant des capteurs de gaz sont disponibles dans le commerce, leur application dans la filière produit de la mer est encore en cours d'expérimentation, mais les premiers résultats sont très encourageants [35,59]

Un nez électronique, permet la mise en évidence de composés volatils dans l'espace de tête (volume d'air situé autour du prélèvement) sans extraction au préalable des divers constituants. L'analyse se fait soit directement (espace de tête statique), soit après diffusion d'un gaz inerte à travers le prélèvement de manière à acheminer les différents composés vers l'unité de mesure (espace de tête dynamique) [59].

Cependant, ces méthodes rapides ne permettent que la détection des composés volatils dont la teneur est élevée, comme les composés sulfurés, les amines et les alcools à courtes chaînes. Les composés volatils responsables des odeurs caractéristiques du poisson frais ne sont présents qu'à une faible concentration, leur analyse par les méthodes rapides n'est donc pas possible.

Les nez électroniques pourront donc bientôt être utilisés pour estimer l'état d'altération du poisson. Les méthodes plus lourdes sont indispensables à la mise

au point des multi capteurs de gaz et doivent encore être développées pour affiner la connaissance sur l'évolution des divers composés volatils durant le stockage du poisson [34].

6.3. Méthodes microbiologiques

L'altération microbienne est la principale cause de perte de la qualité de la chair du poisson. Même si le produit est conservé sous glace, le développement bactérien n'est pas stoppé. Les bactéries utilisant différents constituants pour leur métabolisme, ceci entraînant des changements de texture, le développement d'odeurs désagréables et une perte de la qualité nutritionnelle. La qualité sanitaire du poisson peut également être compromise par le développement de bactéries initialement présentes (bactéries indigènes) ou ayant contaminé le poisson lors de manipulations.

Des normes ou critères microbiologiques ont été fixés pour la commercialisation de poissons ; elles fixent les qualités admises pour que le produit soit de qualité satisfaisante.

Deux catégories de critères sont définies [51] :

- Critères de sécurité : Il s'agit de critères applicables aux produits mis sur le marché.
Ce sont des critères d'acceptabilité d'un produit ou d'un lot.
- Critères d'hygiène des procédés : Ces critères s'appliquent au stade de la production et ne s'appliquent pas aux produits mis sur le marché. Il s'agit de critères indiquant l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production.

En conclusion, Les produits de la pêche et d'aquaculture présentent des risques spécifiques pour la santé publique. Ils peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires ou de maladies d'origines alimentaires chez l'homme. Les dangers liés aux poissons concernent la présence, le développement ou la survie dans les produits d'agents biologiques, chimiques ou physique, susceptibles d'entraîner un effet néfaste sur la santé des consommateurs.

L'apparition de ces dangers peut résulter :

- De la contamination des poissons par des agents biologiques environnementaux
- De la contamination primaire in situ des poissons provenant d'une pollution des zones de pêches d'origine humaine.
- De la contamination des poissons par des bactéries pathogènes.
- De l'altération intrinsèque du produit (histamine, amines biogènes de dégradation).

L'étude des phénomènes d'altération responsable des modifications post-mortem du poisson a permis la mise au point de nombreuses techniques d'évaluation de l'état de fraîcheur. Ces outils ont par là même contribué à dégager des critères concrets permettant de mieux définir la notion de fraîcheur. Ce concept, difficilement appréciable du fait de sa constante évolution, peut aujourd'hui être assuré par l'appréciation des caractères organoleptiques, par le biais de la concentration en ABVT, TMA et par la mesure du facteur K.

Même si aucune de ces méthodes ne peut s'appliquer à toutes les espèces et à tous les types de production, les industriels disposent d'une gamme de techniques différentes plus ou moins bien adaptées à leurs activités spécifiques.

CHAPITRE 7

EFFET DES PRATIQUES D'ELEVAGE SUR LA CONTAMINATION ET LA REPONSE IMMUNITAIRE DU BAR (*DICENTRARCHUS LABRAX*) CULTIVE DANS DES ETANGS AVEC DE L'EAU CHAUFEE

7.1. Problématique

L'aquaculture est aujourd'hui l'une des industries alimentaires les plus dynamiques. La production mondiale de poisson a connu une croissance régulière au cours des dernières décennies et fournit déjà la moitié de la consommation mondiale de fruits de mer. Dans ce contexte, l'aquaculture se développe, et s'intensifie dans presque toutes les régions du monde. En Algérie, elle était pratiquement stagnée pendant de nombreuses années, mais avait une production relativement bonne en 2008 et 2009. L'Algérie essaie depuis de nombreuses années de diversifier sa production aquacole en quantité et en qualité. La tendance actuelle est sans doute le développement de la structure de pisciculture marine, comme le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) et la dorade (*Sparus aurata*) [4, 5]. Les technologies de production de poisson les plus courantes en Algérie sont les cages flottantes dans les zones côtières, et les étangs terrestres. Cependant, le développement et la croissance rapides de l'aquaculture ont entraîné des foyers de maladies dans les exploitations piscicoles qui causent de graves pertes économiques et constituent un important facteur limitant pour l'aquaculture.

Le bar (*Dicentrarchus labrax*) est l'une des espèces téléostéens élevée en Algérie. Parmi les maladies bactériennes affectant cette espèce, la vibriose qui au stade précoce de la vie provoque une forte mortalité.

La vibriose est l'une des maladies bactériennes les plus répandues chez les poissons, elle est causée par plusieurs genres de *Vibrio*, famille des Vibrionaceae [19]. Cette famille bactérienne se nourrit d'eau saumâtre et d'eau de mer chaude et est répandue dans les milieux côtiers marins et estuariens. En raison du réchauffement climatique, les *Vibriospécies* se sont également propagées à de nouveaux écosystèmes tempérés [20]. *Vibrio spp.* Sont dans beaucoup de cas des pathogènes facultatifs qui peuvent coloniser facilement des lésions externes ou, en

tant que partie de la flore intestinale normale du poisson, déclenchent une infection, vraisemblablement lorsqu'un facteur de stress prédisposant génère une défaillance du mécanisme régulant la perméabilité intestinale postérieure. Pratiquement toutes les espèces de poissons marins et estuariens de tout âges sont sensibles. *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* et *V. ordalii* ont été associés à des mortalités chez les poissons d'élevage et les poissons sauvages dans les eaux tempérées et chaudes [19,21]. L'identification de l'espèce peut présenter quelques difficultés car la taxonomie des Vibrionaceae a subi de nombreuses révisions récentes. La vibriose du poisson se caractérise par une septicémie hémorragique systémique avec des signes cliniques qui sont : l'anémie, la léthargie, l'assombrissement de la peau, l'épaississement de la cornée, l'érythème de l'évent et la base des nageoires, des vaisseaux sanguins visqueux congestionnés et l'accumulation de liquide dans les intestins. En aquaculture, cette maladie est responsable de graves pertes économiques dans le monde entier. Cela est particulièrement important pour le loup de mer européenne, une espèce très sensible aux facteurs de stress et aux agents pathogènes, où les infections peuvent parfois occasionner des pertes économiques importantes. Ce travail a porté sur le loup de mer européenne cultivée dans des étangs en utilisant l'eau chaude d'une centrale électrique en Algérie, région de cap jinet. Ainsi, nous avons évalué l'apparition de pathogènes bactériens dans l'eau et les spécimens de loup de mer européenne (*Dicentrarchus labrax*), ainsi que l'état métabolique, biochimique et immunitaire.

Cette partie visait à répondre à la question suivante :

Comment l'environnement et les pratiques d'élevage influent sur la contamination et la réponse immunitaire du bar (*Dicentrarchus labrax*) élevé en aquaculture intensive ?

7.2. Matériel et méthodes

7.2.1. Caractérisation de la ferme aquacole et présentation des cas

La ferme ONDPA (Office National de Développement et de Protection de l'Aquaculture) est située à 77 km d'Alger et à 30 km à l'est de la wilaya de Boumerdès, dans la ville de Djinet, en Algérie. C'est une coentreprise algéro-espagnole qui produit la dorade (*Sparus aurata*) et de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) dans des étangs alimentés par l'eau de mer chauffée en raison du rejet d'une centrale électrique voisine. En effet, L'utilisation de l'eau chaude rejetée par la centrale électrique implique que dans la période de l'été la température de l'eau augmente et il ya un impact sur la croissance des microorganismes. Dans cette ferme, les poissons sont soumis à de multiples facteurs de stress, y compris une forte densité dans les étangs, une mauvaise qualité de l'eau, une mauvaise manipulation des poissons par un personnel mal formé et l'absence de plans de gestion sanitaire et de prophylaxie HACCP (analyse des risques et points critiques).

La ferme de l'ONDPA dispose de 26 étangs de 40 m³ pour la culture de la dorade et de loup de mer en circuit ouvert, Munis d'un distributeur pour l'alimentation à la demande. En septembre 2014, un foyer clinique de maladie à forte mortalité a été détecté dans plusieurs étangs des juvéniles de loup de mer. Les signes cliniques externes de la maladie comprenaient l'érosion des nageoires (en particulier la pourriture de la caudale), les lésions ulcératives circulaires, des pétéchies peau et des hémorragies de la peau dans la région abdominale et thoracique. Selon la littérature et les signes cliniques observés, ces poissons souffraient de la maladie de type vibriosis [60].

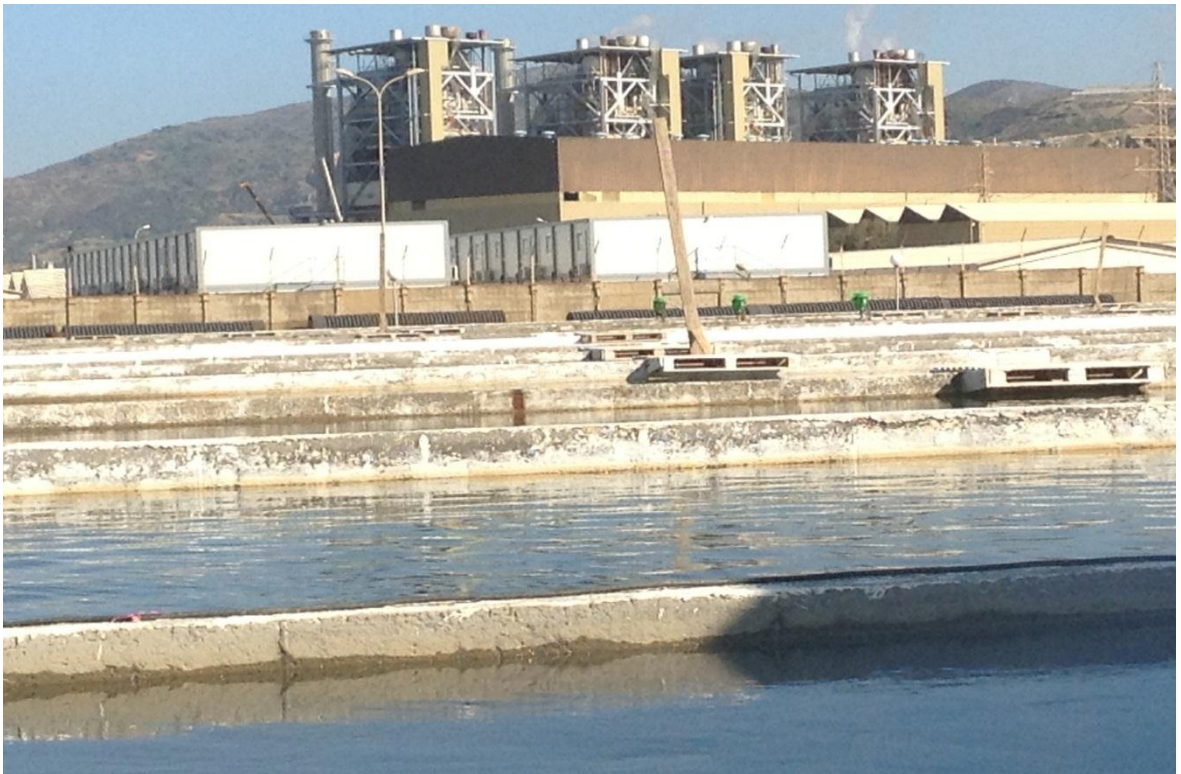


Figure 7.1: ferme de l'ONDPA (1), Djinet (Boumerdes) Photo personnelle.



Figure 7.2 : Etangs (bassins) d'élevage, ferme ONDPA, Djinet. Photo personnelle.

7.2.2. Échantillonnage des poissons et de l'eau

Les spécimens de poissons ont été choisis parmi différents étangs. Un étang sans signes apparents de maladie a servi de témoin ou contrôle alors que trois d'autres étangs contenant des poissons avec des signes clairs de la maladie ont été utilisés pour échantillonner le poisson malade. 60 spécimens juvéniles du bar (*Dicentrarchus labrax*) ayant un poids de $52,6 \pm 9,4$ g ont été échantillonnés (15 échantillons par étang) (45 poissons malades et 15 poissons apparemment sains) en octobre 2014. La température de l'eau, le pH et la salinité étaient respectivement de 27°C, 8.28 et 36.5 ‰.

Des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine caudale. Ces échantillons de sang frais ont été immédiatement congelés pour des études d'expression génique tandis que d'autres ont été laissés à coaguler à 4 ° C et centrifugés. Le sérum a été congelé à -80 ° C jusqu'à utilisation pour l'analyse immunologique et métabolique. Les fragments des branchies et de l'intestin ont été mélangés avec 225 ml d'eau de peptone tamponnée. Cette solution mère a été utilisée pour la détection de différents microorganismes. Des échantillons d'eau de chaque étang ont également été recueillis à une profondeur de 15 à 20 cm sous la surface de l'eau en utilisant des bouteilles en plastique stériles de 500 ml.

7.2.3. Analyse microbiologique d'échantillons d'eau et de tissus

Des analyses microbiologiques ont été effectuées sur des échantillons d'eau et de tissus fraîchement isolés à l'aide de réactifs communs (tous issus de BioMérieux) et de techniques [61] comme suit :

- **Coliformes fécaux Totaux dans l'eau :**

On a filtré des particules de 100 ml de chaque échantillon en utilisant des filtres en papier de 0,45 µm. Les filtres ont été placés sur des plaques de gélose de Tergitol et incubés en aérobic à 37 ° C (pour les coliformes totaux) et 45 ° C (pour les coliformes fécaux) pendant 24-48 h.

- **Flore mésophile aérobie totale à 30°C (FMAT) :**

Des échantillons d'eau et de tissu ont été incubés sur des plaques de gélose (PCA) à 30 ° C pendant 72 h.

- **Levures et moisissures :**

Des échantillons d'eau ont été incubés sur oxytétracycline glucose agar (OGA) avec des suppléments à 20 ° C pendant 3 à 5 jours.

- **Les entérocoques fécaux :**

Constitués de streptocoques infectieux et incluent *E. bactericus*, *E. faecium* [61]. Le milieu de Slanetz et Bartley (MSB) a été utilisé pour la détection des entérocoques fécaux par la technique de filtration membranaire. Pour cela, 50 ml d'eau de mer ont été filtrés à travers des filtres en papier de 0,45 µm. Les filtres ont été placés sur des plaques de gélose SBM et incubés à 37 ° C pendant 24 h. La membrane a été examinée avec une lentille grossissante sous une bonne lumière et toutes les colonies brun rond ont été comptées comme des entérocoques présomptifs.

- ***Salmonella spp.* :**

L'isolement de *Salmonella* a été réalisé au moyen d'un enrichissement préalable, d'un enrichissement sélectif, d'un isolement et d'étapes de confirmation. Un premier pré-enrichissement a été effectué en incubant la solution mère à 37 ° C pendant

24 h. Pour le premier enrichissement sélectif, les échantillons ont été incubés dans un bouillon d'enrichissement sulfa vert brillant (SVB) à 37 ° C pendant 24 h. Cet échantillon a été divisé en deux: le premier a été utilisé pour l'isolement dans des plaques d'agar entérique de Hektoen, en les incubant à 37 ° C pendant 24 h, et le second a été enrichi à nouveau avec SBG, en utilisant 0,1 ml d'échantillon et 10 ml de SBG et incubation à 37 ° C pendant 24 h, puis on l'isole dans des plaques d'agar entérique Hektoen comme ci-dessus. Des colonies suspectes présentant une morphologie typique de *Salmonella* ont été isolées sur de l'agar nutritive et confirmées par le kit d'identification bactérienne API20E.

- ***Staphylococcus aureus* :**

Pour les échantillons d'eau de mer, 100 ml d'eau de mer ont été filtrés en utilisant un filtre en papier de 0,45 µm déposé sur des plaques de gélose au sel de mannitol (MSA, milieu de Chapman) incubées à 37 ° C pendant 2 à 8 h. Les mannitolfermentateurs tels que *S. aureus* apparaissent sous forme de colonies jaunes avec des zones jaunes dans les milieux. Pour les échantillons de tissus, 0,2

ml de la solution mère ont été placés sur de Baird Parker agar et incubés à 37 ° C pendant 48 h. *S. aureus* produit typiquement une colonie brillante, noire, convexe entourée de zones claires. Des colonies isolées ont été cultivées sur des tubes d'infusion cérébrale et incubées à 35 ° C pendant 12 à 24h. Ensuite, on a mélangé 0,2 ml de la culture obtenue dans un tube d'hémolyse stérile avec 0,3 ml de plasma de lapin, incubé à 37 ° C et observé jusqu'à quatre heures. Le résultat positif est indiqué par la gélification du plasma (recherche d'une enzyme qui coagule), qui reste en place même après l'inversion du tube. Si l'essai reste négatif jusqu'à quatre heures à 37 ° C, le tube est maintenu à température ambiante pendant une nuit d'incubation.

- ***Pseudomonas aeruginosa* :**

Pour les échantillons d'eau de mer, 100 ml d'eau de mer ont été filtrés en utilisant un filtre à papier de 0,45 µm, placé sur des plaques d'acide de ceftrimidénalidixic et incubés à 37 ° C pendant 24 h.P. Les colonies *aeruginosa* apparaissent pigmentées en bleu, bleu-vert, rouge ou non pigmenté mais sont fluorescentes sous lumière UV (360 nm).

- ***Clostridium perfringens* :**

Pour les échantillons d'eau, on a ajouté 1 ml de la solution mère à une boîte de Petri stérile et on a ajouté 15 ml de milieu de cyclosérine de tryptone-sulfite cyclosérine (TCS) et on les a mélangés doucement. Les plaques ont été incubées dans des bocal anaérobies à 37 ° C pendant 24 h. *C. perfringens* typique produit des colonies noires, souvent entourées par un précipité noir. Pour les échantillons de tissus, ils ont été incubés sur un milieu de viande et de foie (VF) avec des compléments à 44 ° C pendant 24h dans un incubateur de culture anaérobie.

- **Test API20E pour les pathogènes potentiels isolés :**

Pour un premier enrichissement, des échantillons d'eau ou de tissus ont été incubés avec de l'eau peptone alcaline à 2% (EPA) à 37 ° C pendant 24 h. A la fin de la période d'incubation, les bactéries ont ensuite été striées sur des plaques de gélose de saccharose de sels de citrate de thiosulfate (TCBS) et incubées à 37 ° C pendant 24 h. Une deuxième étape d'enrichissement a également été réalisée en utilisant 1 ml du premier enrichissement et 10 ml d' EPA. Dans l'étape suivante,

l'isolation sur TCBS a été effectuée comme décrit ci-dessus. Des colonies typiques de *Vibrio spp.* ont été subcultivées sur une gélose nutritive saline suivie d'une confirmation biochimique à l'aide de l'API20E et d'une galerie de culture de sel constituée d'une série de tubes d'eau de peptone alcaline contenant 0, 3, 6, 8 et 10% de NaCl.

7.2.4. Détermination des paramètres métaboliques dans le sérum

La présence d'aspartate aminotransférase (AST), de créatine kinase (CK), d'acide urique (AU), de glucose (GLU), de calcium (Ca^{++}), de phosphore (PHOS), de protéine totale (TP), d'albumine (ALB), de globuline) Et de potassium (K^+) ont été déterminés dans le sérum de spécimens de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) en utilisant des échantillons de 100 μ l de sérum dans un analyseur automatisé (VetScan, Abaxis Veterinary Diagnostics) et rotor (VetScanAvianeReptilian Profile Plus) selon les instructions du fabricant [62].

7.2.5. Paramètres immunitaires innés du sérum

- **Activité de peroxydase**

L'activité peroxydase dans le sérum a été mesurée selon un dosage colorimétrique [63]. En résumé, 10 μ l de sérum ont été dilués avec 50 μ l de tampon Hank's buffer (HBSS) sans Ca^{+2} ou Mg^{+2} dans des plaques à fond plat avec 96 puits. En tant que substrats, on a ajouté 100 μ l de 20 mM de TMB et 5 mM de H_2O_2 . La réaction de changement de couleur a été arrêtée après 2 minutes en ajoutant 50 μ l d'acide sulfurique 2 M et la DO a été lue à 450 nm dans un lecteur de plaques. Des échantillons standards sans sérum ont été utilisés comme blancs. Une unité a été définie comme la quantité produisant un changement d'absorbance de 1 et l'activité exprimée en Uml^{-1} de sérum.

- **Activité protéase**

L'activité de protéase a été quantifiée en utilisant l'analyse d'hydrolyse d'azocasein [64]. En bref, 100 μ l de mucus ont été incubés avec 100 μ l de tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM contenant 0,7% d'azocasein (Sigma) pendant 19 h à 30 ° C sous agitation continue. On a arrêté la réaction en ajoutant 4,6% d'acide trichloroacétique (TCA). Après centrifugation (6000 g, 5 min), les surnageants ont été transférés sur une plaque à 96 puits par triplicat et 100 μ l de 0.5 N NaOH ont

été ajoutés à chaque puits. La DO à 450 nm a été mesurée en utilisant un lecteur de plaques. Le sérum a été remplacé par la trypsine (5 ug ml⁻¹, Sigma), comme témoin positif (100% de l'activité protéase) ou par tampon, comme témoin négatif (0% d'activité).

- **Activité antiprotéase**

L'activité antiprotéase totale a été déterminée par la capacité du sérum à inhiber l'activité de la trypsine [65]. En bref, 10 µl de sérum ont été incubés (10 min, 22 ° C) avec le même volume de solution de trypsine standard (5 mg ml⁻¹). Après addition de 100 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM et 125 µl de 0,7% d'azocase, les échantillons ont été incubés (2 h, 30 ° C) et, après addition de 250 µl de TCA à 4,6%, une nouvelle incubation (30 Min, 30 ° C) a été faite. Le mélange a ensuite été centrifugé (10 000 tr / min, 10 min), les surnageants ont été transférés dans une plaque à 96 puits en triplicat contenant 100 µl par puit de NaOH 0,5 N et la DO a été lue à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques. Pour un témoin positif, le tampon a remplacé le sérum et la trypsine, et pour un témoin négatif, le tampon a remplacé le sérum. L'activité antiprotéase a été exprimée en termes de pourcentage d'inhibition de la trypsine selon la formule : % d'inhibition de la trypsine = 100 x (DO de la trypsine - DO de l'échantillon) trypsineDO⁻¹.

- **Activité bactéricide**

Les bactéries opportunistes marines *Vibrio anguillarum* pathogènes ont été utilisées. Les bactéries ont été cultivées dans des plaques de gélose à 25 ° C dans du soja tryptique (TSB, Sigma). Puis, des colonies simples fraîches ont été diluées dans 5 ml de milieu de culture liquide approprié et cultivées pendant 16 h à 25 ° C sur un incubateur orbital à 200-250 tr / min.

L'activité antimicrobienne du sérum a été déterminée en évaluant les courbes de croissance bactérienne [66]. On a placé des aiguilles de 10 µl de chacune des dilutions bactériennes (1/10) dans des plaques à 96 puits à fond plat et on les a cultivées avec des volumes égaux de sérum de loup de mer et incubé pendant deux heures. Ensuite, on ajoute 150 µl de milieu de culture. La DO des échantillons a été mesurée à 620 nm à intervalles de 30 minutes pendant 24 h à 25 ° C. Des échantillons sans bactéries ont été utilisés comme blancs (témoin négatif). Des

échantillons sans sérum ont été utilisés comme témoins positifs (croissance à 100% ou activité bactéricide à 0%).

- **Taux d'immunoglobulines totales M (IgM)**

Les niveaux totaux d'IgM ont été analysés en utilisant le dosage immuno-enzymatique (ELISA) « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ». Ainsi, 10µl de sérum / puits ont été placés dans des plaques à 96 puits à fond plat en triple et enrobés par incubation pendant une nuit à 4 ° C avec 100 ml de tampon carbonate-bicarbonate 50 mM, pH 9,6. Après trois rinçages avec 100 ml par puits de PBS-T (tampon phosphate 0,1 M (PBS) et Tween 20 à 0,05%, pH 7,3), les plaques ont été bloquées pendant 2 h à température ambiante avec un tampon de blocage contenant 3% de BSA dans du PBS-T. , suivi par trois nouveaux rinçages avec du PBS-T. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 1 heure avec 100 ml par puits d'anticorps monoclonal IgM anti-bar de souris (Aquatic Diagnostics Ltd.) (1/100 en tampon de blocage), lavées et incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG-HRP de souris (1 / 1000 en mémoire tampon bloquante, Sigma). Après rinçage exhaustif avec du PBS-T, les plaques ont été développées en utilisant 100 ml d'une solution à 0,42 mM de de 3,3',5,5' -tétraméthylbenzidine chlorhydrate (TMB, Sigma), préparée quotidiennement dans un tampon acide citrique 100 mM / acétate de sodium (pH 5,4) contenant 0,01% de H₂O₂. La réaction a été laissée se dérouler pendant 10 min et arrêtée par l'addition de 50 ml de H₂SO₄ 2 M, les plaques ont été lues à 450 nm dans un lecteur de plaques (FLUOstar Omega, BMG Labtech). Les contrôles négatifs consistaient en des échantillons sans sérum ou sans anticorps primaire, dont les valeurs de densité optique (DO) étaient soustraites pour chaque valeur d'échantillon.

7.2.6. L'expression des gènes par PCR en temps réel (PCRq)

L'expression génique relative a été analysée dans des échantillons de sang en utilisant la PCR en temps réel (qPCR) et la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ [67]. L'ARN total a été extrait à partir de prélèvements de sang de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) en utilisant le réactif Trizol (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. L'ARN a ensuite été traité avec la DNase I (Invitrogen) pour éliminer la contamination par l'ADN génomique. L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen) avec une amorce oligo-dT18. L'expression de onze gènes sélectionnés a été analysée par PCR en temps réel, réalisée avec un instrument ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) en utilisant des réactifs nucléaires SYBR Green PCR (Applied Biosystems) comme décrit précédemment [68]. Ces gènes codent la sous-unité β du récepteur des cellules T (tcrb), la chaîne lourde de l'immunoglobuline M (igmh), l'eosinophil peroxydase-type (mpx), l'interleukine 1β (il1b), le lysozyme (lyz), le complément 3 (c3) Phosphatase (alp), dicentracin (dic) et hepcidine (hamp). Pour chaque ARNm, l'expression génique a été corrigée par la teneur en facteur d'allongement 1-alpha (ef1a) dans chaque échantillon. Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 7.1. Dans tous les cas, chaque PCR a été réalisée avec des échantillons en triple.

7.3. Analyses statistiques

Les données ont été analysées statistiquement par le test de Levene pour l'égalité des variances et des échantillons indépendants. T-test pour la comparaison des moyennes. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 20. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à un niveau de confiance de 95%.

Tableau 7.1: Les amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

Gène	Nom de la protéine	Acc. nombre	Séquence (5'-3')
<i>ef1a</i>	Facteur d'allongement 1 ^α	AJ866727	CGTTGGCTTCAACATCAAGA GAAGTTGTCTGCTCCCTTGG
<i>il1b</i>	Interleukine 1 β	AJ269472	CAGGACTCCGGTTTGAACAT GTCCATTCAAAGGGGACAA
<i>lyz</i>	Lysozyme	FN667957	ATTCCTGGCTGGAACACAG GAGCTCTGGCAACAACATCA
<i>tcrb</i>	β Sous-unité du récepteur des cellules T	FN687461	GACGGACGAAGCTGCCCA TGGCAGCCTGTGTGATCTTCA
<i>igmh</i>	Chaîne lourde d'immunoglobuline M	FN908858	AGGACAGGACTGCTGCTGTT CACCTGCTGTCTGCTGTTGT
<i>c3</i>	Complément composant 3	HM563078	ACCAAAGAACTGGCAACCAC CTAGCAGTCGGTCAGGGAAC
<i>alp</i>	Phosphatase alcaline	FJ860000	TTACCTCTGTGGGGTCAAGG TAGCCCATTTGAGGATGGAG
<i>dic</i>	Dicentracin	AY303949	GGCAAGTCCATCCACAAACT ATATTGCTCCGCTTGCTGAT
<i>hamp</i>	Hepcidine	DQ131605	CCAGTCACTGAGGTGCAAGA GCTGTGACGCTTGTGTCTGT
<i>mpx</i>	Eosinophilperoxidase-like	DLAgn_00118340*	GAAGAGTGGGGCCTTTGTTT CTGGGCCTCAGTGAAGACTC

* Séquence obtenue à partir de <http://seabass.mpipz.mpg.de/>

7.4. Résultats

7.4.1. Analyse microbiologique des échantillons

Les résultats du présent travail ont révélé une contamination importante de l'eau par différents microorganismes tels que les coliformes fécaux, *P. aeruginosa*, *V. alginolyticus*, levures et moisissures (tableau 7.2).

Tableau 7.2: Analyse microbiologique des échantillons d'eau.

Coliformes totaux et fécaux	+
Flore mésophile aérobie totale à 30°C	+
Levures et moisissures	+
Entérocoques fécaux	-
<i>Salmonella spp.</i>	-
<i>S. aureus</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	+
<i>C. perfringens</i>	-
Pathogènes potentiels	+ <i>V. alginolyticus</i>

Les résultats de l'analyse microbiologique des tissus de poissons ont été positifs pour la flore aérobie totale et plusieurs pathogènes potentiels (tableau 7.3).

Tableau 7.3: Analyse microbiologique de tissus de poissons de *D. labrax* en bonne santé et malades.

Groupe	FMAT à 30°C	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	Pathogènes potentiels
En bonne santé	+	-	-	-	+ <i>Vibrio. alginolyticus</i>
					+ <i>Aeromonas hydrophila</i>
					+ <i>Pasteurella multocida</i>
					+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
					+ <i>Proteus vulgaris</i>
Malades	+	-	-	-	+ <i>Grimontia (Vibrio) hollisae</i>
					+ <i>Vibrio. alginolyticus</i>
					+ <i>Aeromonas hydrophila</i>
					+ <i>Pasteurella multocida</i>
					+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
					+ <i>Proteusvulgaris</i>
					+ <i>Proteus. mirabilis</i>

Les bactéries isolées ont été identifiées par le kit API20E et se sont révélées être *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* et *P. mirabilis* (tableau 7.4). Toutes les espèces bactériennes isolées de poissons malades étaient également présentes dans des poissons apparemment sains Sauf *Grimontia hollisae* (tableau 7.3), qui n'était présente que dans les tissus de poissons atteints de maladie.

Tableau 7.4: Caractéristiques biochimiques (système d'essai API20E) de bactéries potentiellement pathogènes isolées de D. labrax malade.

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>G.hollisae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. multocida</i>
β-galactosidase enzyme	-	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	+	-	-	-
Lysinedecarboxylase	+	-	-	-	-	-
Ornithinedecarboxylase	+	-	-	+	-	-
Utilisation de citrate	-	-	-	+	+	+
Production de sulfure d'hydrogène	-	-	-	+	+	-
Enzyme urease	-	-	-	+	+	-
Tryptophandéaminase	-	+	-	+	+	-
Enzymetryptophanase	+	+	-	-	+	+
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	+	-	-	+	+	-
Fermentation de glucose	+	+	+	+	+(-)	+
Fermentation de mannose	+	-	+	-	-	+(-)
Fermentation de inositol	-	-	-	-	-	-
Fermentation de sorbitol	-	-	-	-	-	+
Fermentation de rhamnose	-	-	-	-	-	-
Fermentation de Saccharose	+	-	+	-	-	+
Fermentation de melibiose	-	-	-	-	+	-
Fermentation de amygdaline	-	-	-	-	-	-
Fermentation de arabinose	-	+	-	-	-	-

7.4.2. Paramètres métaboliques dans le serum

Plusieurs paramètres métaboliques ont été déterminés dans le sérum de spécimens du bar (*D. Labrax*) apparemment sains et malades (tableau 7.5.). Chez les poissons malades, tous les paramètres mesurés ont été augmentés, mais seuls les niveaux de phosphore ont atteint un niveau significatif.

Tableau 7.5: Paramètres métaboliques dans le sérum de spécimens sains ou malades du bar (*D. labrax*). Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. Les données ont été analysées par le test de Levene pour l'égalité des variances et les échantillons indépendants T-test pour la comparaison des moyennes. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les échantillons sains et malades ($P < 0,05$). L'aspartate aminotransférase (AST), les acides biliaires (AB), la créatine kinase (CK), l'acide urique (AU), le glucose (GLU), le calcium (Ca^{++}), le phosphore (PHOS), la protéine totale (PT), l'albumine (ALB) Globuline (GLOB) et le potassium (K^+).

Paramètre	Unités	En bonne santé	Malades	Test de Levene	Valeur P
AST	U/L	13 \pm 1.73	26.83 \pm 6.68	0.018	0.202
AB	umol/L	9.00 \pm 0.82	22.33 \pm 4.11	0.203	0.145
CK	U/L	15.5 \pm 2.86	33.25 \pm 6.59	0.041	0.392
AU	mg/dL	0.4 \pm 0.21	0.93 \pm 0.33	0.088	0.216
GLU	mg/dL	93.10 \pm 55.52	217.67 \pm 52.09	0.431	0.308
Ca⁺⁺	mg/dL	2.13 \pm 0.03	2.35 \pm 0.26	0.049	0.586
PHOS	mg/dL	3.87 \pm 0.15	7.37 \pm 1.06*	0.121	0.021
PT	g/dL	1.83 \pm 0.38	2.33 \pm 0.20	0.687	0.33
ALB	g/dL	0.83 \pm 0.15	1.03 \pm 0.16	0.222	0.387
GLOB	g/dL	0.43 \pm 0.43	0.88 \pm 0.28	0.95	0.436
K⁺	mmol/L	0.33 \pm 0.33	0.73 \pm 0.50	0.177	0.526

7.4.3. Paramètres immunitaires innés du sérum

Les activités de la protéase sérique, de l'antiprotéase et de la peroxydase n'ont pas été affectées à un niveau significatif par l'infection (figure 7.3;7.4;7.5). En revanche, l'activité bactéricide sérique contre *V. anguillarum* a été significativement inhibée (figure 7.6). le taux d'immunoglobulines totales M (IgM) chez les poissons infectés était inférieur à celui des poissons sains (contôle) (figure 7.7).

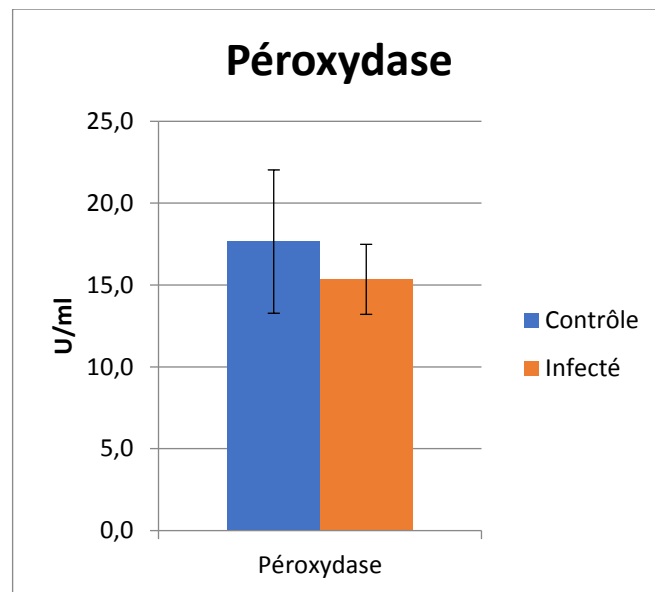


Figure 7.3: Activité de la peroxydase sérique. (Uml^{-1})

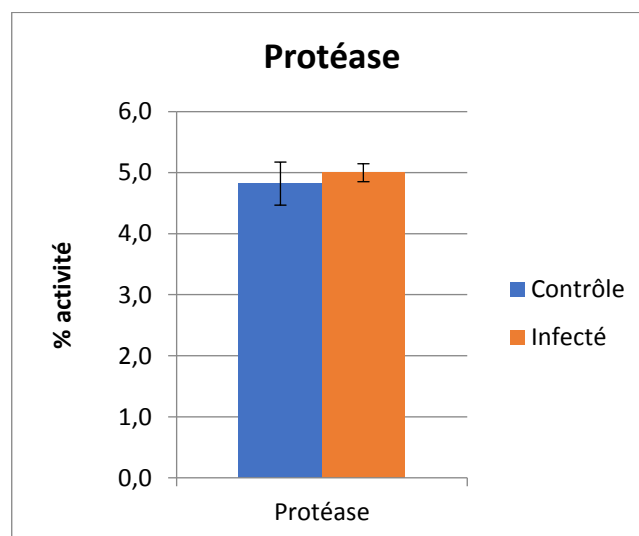


Figure 7.4: Activité de la protease sérique (%)

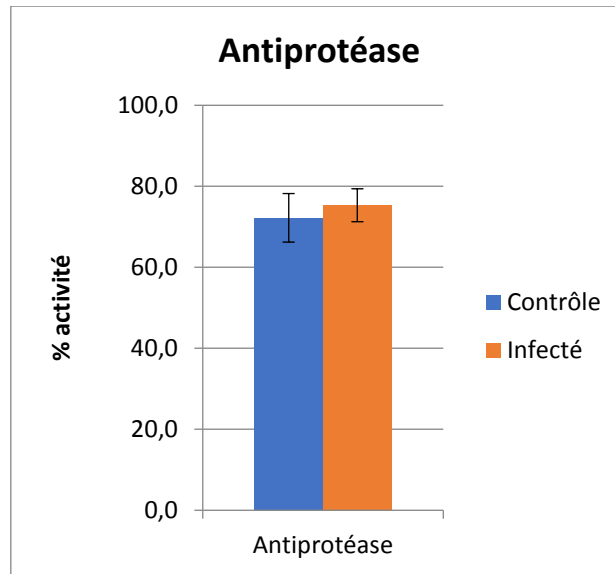


Figure 7.5: Activité de l'antiprotéase sérique (%)

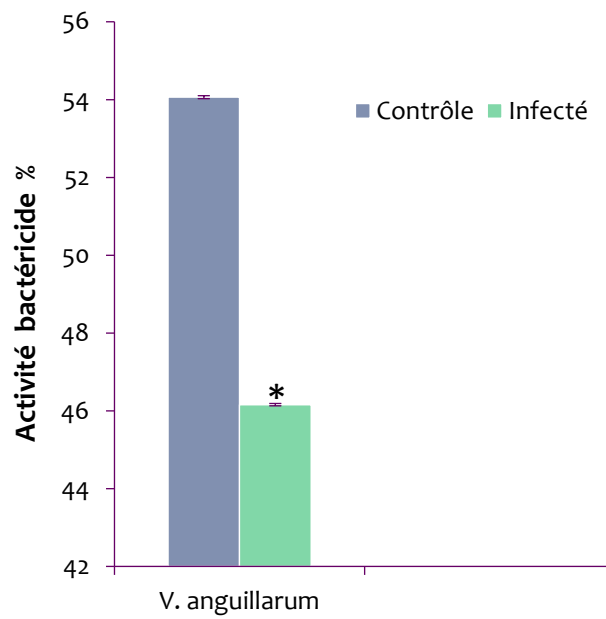


Figure 7.6: l'activité bactéricide sérique contre *V. Anguillarum* (%)

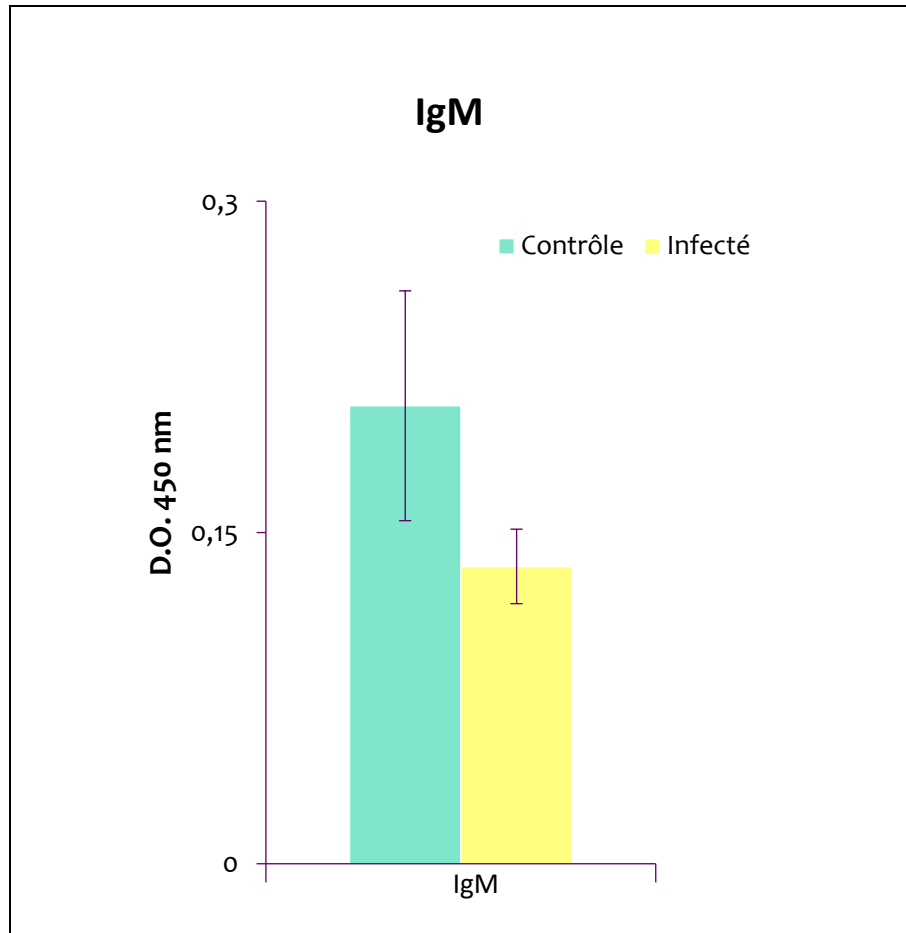


Figure 7.7: Taux d'immunoglobulines totales M (IgM), D.O 450nm

Figure 7.3, 7.4, 7.5, 7.6 et 7.7: Activités de peroxydase (Uml^{-1}), de protéase (%), d'antiprotéase (%), l'activité bactéricide contre *V anguillarum* (%) et Taux d'immunoglobulines totales M (IgM) D.O 450 nm dans les échantillons du sérum des poissons du bar apparemment en bonne santé (contrôle) ou de type suspicion vibriose (infecté). Les barres représentent les moyennes \pm SEM. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les groupes ($P \leq 0,05$).

7.4.4. Expression des gènes liés à l'immunité

L'expression des gènes liés au système immunitaire étudiés dans le sang de spécimens apparemment sains et malades est présentée dans la Figure 7.8. L'expression de *il1b*, *mpx*, *c3* et *dic* était significativement plus faible dans le sang de poissons malades par rapport aux valeurs détectées dans le sang de poissons en bonne santé tandis que la transcription de *ighm* était régulée à la hausse dans des spécimens de poissons malades.

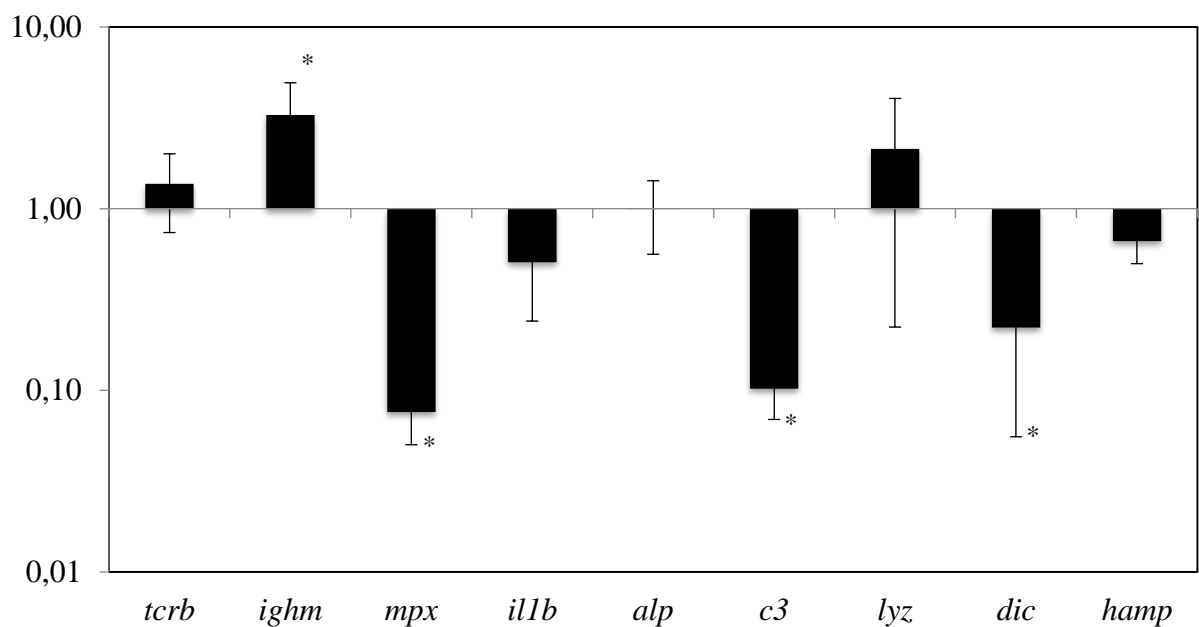


Figure 7.8: Expression des gènes déterminée par PCR en temps réel dans le sang des spécimens du bar (*D. Labrax*) infectés par la vibriose. Les barres représentent les moyennes \pm écart type pour suspicion de vibriose par rapport au témoin (échantillons sains). Les astérisques indiquent des différences significatives entre les groupes ($P \leq 0,05$).

7.5. Discussion

Le bar (*Dicentrarchus labrax*) est un poisson de grande valeur économique dans la région méditerranéenne. Parmi les pathologies bactériennes qui menacent cette espèce, principalement lorsqu'elles sont cultivées à des densités élevées dans la pisciculture, la vibriose, la pasteurellose et la photobactériose qui entraînent des mortalités significatives et des pertes économiques très importantes. [19, 60, 69-70] Et sont causés par des bactéries gram-négatives de la famille des Vibrionaceae. Les principaux agents bactériens identifiés de la famille des Vibrionaceae (bactéries gram-négatives) sont: *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. Harveyi*. [60,70,71]. Les maladies peuvent causer une mortalité significative dans les installations de pisciculture une fois qu'une épidémie est en cours et peuvent se propager rapidement lorsque les poissons sont confinés dans des systèmes commerciaux lourdement approvisionnés, et la morbidité peut atteindre 100% des établissements infectés. Ces bactéries produisent, des lésions et des ulcères cutanés très semblables à ceux observés dans nos échantillons. y compris l'érosion des nageoires et des opercules, des lésions ulcératives hémorragique despetechies dans la peau au niveau des régions abdominale et thoracique, nous les attribuons à la maladie de type vibriose [60].

Nous avons effectué une caractérisation bactériologique classique dans des échantillons d'eau et de tissus de poissons. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas une forte présence de microorganismes dans l'eau. Cette constatation écarte la contamination par les travailleurs de la ferme aquacole et que la présence élevée de microorganisme est probablement due à la densité élevée de poissons et à la température élevée d'eau depuis que ceci est libéré d'une centrale électrique. De plus, l'analyse des tissus internes a révélé des microbiotes très semblables chez les poissons apparemment sains et malades. La caractérisation des bactéries par API20E nous a permis d'identifier *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis*. Cela rend difficile de déterminer l'agent étiologique réel produisant la maladie et constitue un handicap important dans les études sur le terrain. *V. Alginolyticus* constitue un envahisseur opportuniste de tissus déjà endommagés, ou un faible pathogène du poisson

stressé et a été isolé à partir de l'eau et / ou des tissus de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) [71,72].

A. hydrophila produit également des ulcères cutanés et une septicémie hémorragique, mais elle est rare dans les eaux marines [73]. Cependant, elle a été isolée comme la seule bactérie qui provoque des ulcères cutanés et des hémorragies dans les poissons marins tels que le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), le bar et la dorade [74, 75]. Cette bactérie n'a pas été isolée dans le milieu de culture TCBS [75], mais nous l'avons trouvée dans les échantillons de loup de mer. Cependant, les autres bactéries identifiées ne sont pas habituelles dans les tissus de poissons marins ou liées à la pathologie du poisson. *P. vulgaris* et *P. mirabilis*, bien que principalement pathogènes chez l'homme, ont également été isolés dans des poissons d'eau douce et des poissons d'eau de mer [76], y compris d'ulcères de peau de poisson [77], bien que leurs propriétés pathogènes pour les poissons n'aient pas été clairement démontrées. Il est intéressant de constater que *P. multocidahas* n'a pas été identifié précédemment chez les poissons. Comme on l'a indiqué dans la littérature, l'identification classique des microorganismes marins est parfois difficile et l'utilisation d'outils à base moléculaire est de nos jours préférée car ils favorisent non seulement l'identification de bactéries isolées, mais ils sont également utiles pour l'identification des bactéries qui ne poussent pas, ou qui ne sont pas sélectionnées avec le milieu de culture utilisé. Il est à noter que la seule bactérie différentiellement identifiée entre les échantillons de loup de mer sain et malade est *Grimontia hollisae*, autrefois inclus dans le genre *Vibrio*. Il s'agit d'un pathogène humain produisant une diarrhée [78], mais il a également été isolé à partir d'échantillons environnementaux. Ainsi, *G. hollisae* a été retrouvé chez La Sériole (*Seriola dumerili*) avec la vibriose [79] ainsi que du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et du tilapia marin (*Oreochromis spilurus*) [80]. De plus, les souches de *G. hollisae* se sont révélées très pathogènes pour le tilapia du Nil [80]. La plupart des études rapportent son manqué de croissance de cultures sur de TCBS.

Bien que d'autres études rapportent une croissance légère. Chez les poissons, nos données combinées à celles du tilapia soutiennent que *G. hollisae* des poissons se développent dans TCBS, ou au moins ces souches. Sur la base de cette étude

microbiologique du bar cultivée dans des eaux chauffées, l'identification et la classification des bactéries mérite une analyse plus approfondie des bactéries isolées et identifiées ainsi que de leur potentiel pathogène.

Les poissons malades souffrent de lésions internes / externes qui peuvent modifier, la physiologie des poissons menant à la mort du poisson. Nous avons évalué certains marqueurs physiologiques des lésions tissulaires afin de déterminer les altérations métaboliques et physiologiques chez le loup de mer souffrant de la maladie de type vibriose. Ainsi, nous avons constaté que la plupart des paramètres métaboliques analysés étaient augmentés chez les poissons malades comparativement à des échantillons apparemment sains bien que seulement les niveaux de phosphore aient atteint un niveau significatif indiquant une altération du rein et de la nutrition. Plusieurs paramètres n'ont pas réussi à atteindre une signification probable en raison de la grande variabilité entre les spécimens qui pourrait être liée au temps différentiel exposé aux bactéries et / ou à l'histoire ou la durée de la maladie. Ainsi, ces données suggèrent une altération naissante des organes rénaux, musculaires, hépatiques et intestinaux, mais d'autres études sont nécessaires pour démontrer clairement si cela est réel ou non.

Nous avons également évalué certains aspects de l'immunité innée sanguine de loup de mer souffrant d'une maladie de type vibriose à des niveaux humoral et transcriptomique. Il existe très peu d'informations concernant l'immunité des poissons après le déclenchement des foyers naturelle d'agents pathogènes et aucune dans le cas des bactéries pathogènes de loup de mer. Ainsi, la plupart des informations reposent sur des études utilisant des infections contrôlées par un laboratoire avec une seule bactérie. Dans notre étude, nous avons trouvé peu de modifications dans les paramètres immunitaires humoraux innés évalués, sauf une diminution significative de l'activité bactéricide des poissons malades. Ce fait suggère que les poissons ne pouvaient pas contrôler l'infection bactérienne et d'expliquer les signes évidents de la maladie par rapport aux poissons apparemment en bonne santé, bien qu'ils montrent la présence d'environ les mêmes agents potentiellement pathogènes. Dans les rares études sur l'activité bactéricide de loup de mer européenne sous des infections contrôlées, les bactéries ne l'ont pas affectée [81] alors que le parasite [82] ou le virus [83] ont augmenté

cette activité. Par exemple, l'infection de loup de mer par des bactéries inactivées *Photobacterium damsela* a entraîné une augmentation des activités de complément, de lysozyme et de protéase, mais n'a pas réussi à modifier l'activité antiprotéase et bactéricide [81].

En ce qui concerne l'expression des gènes, nous avons également trouvé des données intéressantes sur l'immunité de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*). L'expression du marqueur de lymphocytes T (*tcrb*) a été augmentée à une mesure non-significative dans le sang, ce qui suggère le manque d'adaptabilité cellulaire dans le poisson malade tandis que le marqueur pour le lymphocyte B (*igmh*) indiquant une réponse immunitaire humorale adaptative. Cela pourrait indiquer que les poissons ont une circulation des cellules productrices d'antigènes suggérant que les poissons ont été vaccinés pour certaines des bactéries ou qu'ils ont été immunisés par les souches bactériennes produisant l'infection. Quoiqu'il en soit, ces niveaux d'IgM semblent ne pas être suffisants pour éliminer les bactéries. En revanche, le marqueur des granulocytes éosinophiles, *mpx*, a abouti à une régulation négative significative indiquant une éosinopénie. Cette constatation, en direction de la transcription vers le bas des molécules antimicrobiennes *c3* et *dic*, pourrait expliquer la diminution de l'activité bactéricide dans le sérum et la sensibilité accrue des spécimens de poissons aux bactéries opportunistes menant à la maladie et aux mortalités observées. Dans les infections contrôlées en laboratoire, par exemple, l'infection sub-létale de loup de mer avec *V. anguillarum* a permis une régulation générale des gènes liés aux peptides antimicrobiens et aux gènes pro-inflammatoires cytokine *il1b* après moins d'un jour, mais habituellement non affectée après 72 h de l'infection dans les tissus immunitaires tels que la rate ou le rein [84]. Ainsi, l'immunité des poissons semble diminuer avec le progrès et la clairance de l'infection et pourrait expliquer en partie nos résultats chez les poissons avec un temps d'infection inconnu, mais toujours plus longue, les 72 h depuis les altérations externes sont tout à fait évidentes. D'autres études sont nécessaires pour évaluer la réponse immunitaire de loup de mer chez des spécimens souffrant d'épidémies naturelles.

En conclusion, le bar (*Dicentrarchus labrax*) élevé dans des étangs avec de l'eau chauffée a montré un nombre élevée de specimens avec comme signe clinique,

érosion des nageoires (en particulier la pourriture de la caudale), des lésions ulcéraives circulaires, des pétéchies et des hémorragies de la peau dans la région abdominale et thoracique. L'examen microbiologique a montré une charge et une diversité très semblables de bactéries dans les tissus provenant de poissons malades apparentés à la vibriose et de *G. hollisae* les seules bactéries présentées différemment dans des spécimens de poissons malades. En ce qui concerne les paramètres métaboliques étudiés de loup de mer, seuls les niveaux de phosphore étaient élevés chez les poissons malades. D'autre part, l'immunité du sang a entraîné une diminution de la transcription du marqueur des éosinophiles (mpx) et des peptides antimicrobiens (c3 et dic) ainsi que de l'activité bactéricide totale, favorisant la croissance bactérienne des pathogènes opportunistes et donc de la maladie.

D'autres études pluridisciplinaires sont nécessaires pour caractériser la biologie des poissons sous une pathologie naturelles, et comment l'élevage et la culture intensive de poisson avec de l'eau chauffée favorise l'apparition et l'incidence des agents pathogènes.

CHAPITRE 8

EFFET DES CONDITIONS ET DU TYPE D'ELEVAGE SUR LA QUALITE ET LA DUREE DE CONSERVATION DU BAR STOCKE SOUS GLACE A TEMPERATURE (0 – 3°C)

8.1. Problématique

Le secteur de la pêche et des ressources halieutiques revêt un caractère stratégique en Algérie, de par ses capacités à contribuer à l'émergence d'une économie productive nationale et à la création et la préservation de l'emploi, mais également par son aptitude à participer à l'amélioration de la sécurité alimentaire du pays. [85]

L'Algérie tente depuis de nombreuses années, de diversifier sa production aquacole, en quantité et en qualité. La tendance actuelle est probablement au développement de structures d'élevages de poissons marins, tels le bar (*Dicentrarchus Labrax*) et la Daurade Royale (*Sparus aurata*).

Les technologies de production piscicole les plus courantes sont : l'élevage en cages flottantes en zones côtières, et l'élevage terrestre en circuit ouvert [86]

De ce fait, de nombreux paramètres doivent être contrôlés pour permettre un bon état de santé et une croissance optimale des poissons d'élevage. Il est nécessaire de maintenir les paramètres de l'environnement dans des limites de confort et d'éviter le développement des pathogènes.

La qualité du poisson frais est indissociable de la notion de fraîcheur. En effet, pour répondre aux exigences des consommateurs, le produit doit posséder des caractéristiques proches de celle du poisson juste après sa capture. Les phénomènes d'altération sont inéluctables et apparaissent dans un laps de temps beaucoup plus court que pour les autres denrées d'origine animale.

Juste après la pêche, les poissons se détériorent rapidement en raison de l'activité hydrique élevée, du pH neutre ou bas, des quantités relativement importantes d'acides aminés libres, de la présence d'enzymes autolytiques et d'un pourcentage élevé d'acides gras insaturés, facteurs qui sont grandement accélérés par la

croissance microbienne [87, 88]. Bien que non définitif, le meilleur moyen de préserver le poisson est la glace, bien qu'il n'évite pas la détérioration. Les phénomènes d'altération sont inévitables et se produisent dans les poissons dans une période beaucoup plus courte par rapport aux autres aliments d'origine animale. Les techniques d'évaluation mise au point par les professionnels de la filière ont permis de définir des critères sensoriels, biochimiques, physiques et microbiologiques, témoins de cette perte de fraîcheur [89].

Toutes ces méthodes permettent de mieux définir la notion d'altération et donc de mieux contrôler.

A l'heure actuelle, l'analyse sensorielle est le moyen le plus utilisé par le secteur des produits de la mer et les services d'inspection pour évaluer la fraîcheur et la qualité des poissons et des produits de la pêche.

L'analyse microbienne est très importante mais coûteuse et longue. Par conséquent, les méthodes de mesure des métabolites bactériennes ou des altérations des produits de mer, notamment le pH, l'azote basique volatil total (ABVT), la tryméthylamine (TMA) et l'acide thiobarbiturique (ATB), sont simples, rapides et représentent un outil fiable utilisé dans le contrôle de la qualité des produits de la mer [90, 91].

Les dosages chimiques de composés témoins ou responsables des phénomènes d'altération (notamment, l'ABVT et la TMA) permettent, d'évaluer le degré de fraîcheur ou d'altération du poisson frais.

Le dosage de l'ABVT garde toujours l'avantage de pouvoir être simple, et rapide, ce qui lui a valu l'intérêt qu'il suscite depuis longtemps.

Le bar européen est probablement la principale espèce d'élevage piscicole dans la zone méditerranéenne à haute valeur économique. Le bar est principalement demandé en format de poisson entier, éviscéré ou non, mais l'utilisation de chair tranchée prête à l'emploi devient également populaire.

Quoi qu'il en soit, il est très apprécié par les consommateurs grâce à sa chair blanche, sa saveur douce et sa faible teneur en matière grasse.

Après la capture, sauvage ou élevé, l'altération du bar dépend de la méthode de conservation et du refroidissement rapide sous glace. Ainsi, plusieurs études ont déterminé la durée de conservation du bar variant de 8 à 19 jours selon la température de refroidissement [92,93,94,95]. Cependant, aucune information n'existe sur le poisson d'élevage.

Ainsi, avec ce travail nous avons cherché à étudier la qualité et la fraîcheur du bar européen et d'étudier la durée de conservation du loup de mer appelé aussi le bar « *Dicentrarchus labrax* » conservé sous glace à des températures de 0 à 3°C, issu de deux types d'élevage aquacole marin intensif : Pisciculture dans des étangs en béton avec de l'eau chaude provenant d'une centrale électrique et Pisciculture en cages flottantes sur mer, par l'évaluation des paramètres sensoriels, chimiques (mesure du pH et teneur en ABVT, TMA) et microbiologiques.

L'étude est menée sur des poissons de *Dicentrarchus labrax* prélevés de la ferme aquacole de cap djinet (élevage dans des bassins en béton, en utilisant l'eau réchauffée d'une centrale électrique à proximité) et la la ferme Hypone aquacole de Zemmouri (élevage dans des cages flottantes en eau de mer), les deux fermes sont situées à la wilaya de Boumerdes en Algérie, à 10 Km de distance en les deux.

L'effet des conditions et de la gestion sanitaire d'élevage sur la fraîcheur du poisson sera pris en considération.

Cette partie de l'étude visait à répondre à la question suivante :

Quelle est l'influence du type et de l'environnement d'élevage sur la durée de conservation du bar entreposé sous glace à 0 – 3°C ?

8.2. Matériel et Méthodes

8.2.1. Échantillonnage

L'étude est menée sur 90 échantillons du bar « *Dicentrarchus labrax* » issus de deux types d'élevage aquacole : un élevage intensif dans des étangs d'élevage de la ferme de Djinet (Figure 8.1) et un élevage intensif en cages flottantes de la ferme de Zemmouri (Figure 8.2). Les deux fermes sont situées dans la wilaya de Boumerdes à l'Est d'Alger (45Km, environ). La distance entre les deux fermes est d'environ 16 Km.

Au moment de l'échantillonnage, en septembre 2014, la température de l'air était de 31°C. La température de l'eau était de 24,5 pour Zemmouri et de 28 pour les installations de Djinet.

Un lot de 45 spécimens (210-240 g de poids corporel) par ferme ont été échantillonnés le même jour. Spécimens entiers, non éviscérés et conservés dans la glace (0-3°C). Les échantillons ont été transportés au Laboratoire Central de l'Intendance de l'Armée Nationale Populaire (Algérie). Les poissons ont été conservés jusqu'à 15 jours, éliminant l'eau fondue par égouttage et la température a été vérifiée toutes les 3 heures pour la maintenir entre 0 et 3 ° C.



Figure 8.1: Ferme de l'ONDPA (2), Djinet (Boumerdes) Photo personnelle.



Figure 8.2 : Ferme Hypone aquacole de Zemmouri, Boumerdes (Photo prise par le personnel de la ferme).

Au laboratoire :

Les premières analyses sont effectuées immédiatement à l'arrivée au laboratoire, le reste du poisson est mis dans des caisses en polystyrène perforées et conservé sous glace de la manière suivante :

Une couche de poisson est alternée avec une couche de glace dans une caisse en polystyrène. L'eau de fusion de glace est drainée par les perforations des caisses. Elle est remplacée au fur et à mesure du stockage par une autre glace, afin de maintenir les mêmes conditions durant toute la période d'expérimentation. Des températures ont été prises chaque 3 heures pour maintenir le poisson dans des températures varies entre 0 et 3°C. Le suivi de conservation a été réalisé sur 15 jours.

Trois poissons par lot ont été pris au hasard immédiatement (J_0) les autres analyses ont été effectués aux J_6 , J_8 , J_{13} , J_{15} . (Jours de conservation).

8.2.2.Méthodes d'analyses effectuées

8.2.2.1. Examen sensoriel

L'examen sensoriel utilisé dans le présent travail est basé sur la description de différents caractères retenus par la méthode de la communauté économique européenne (CEE n°2406/96) [46].

Les caractères retenus sont les suivants :

- Peau : mucus, pigmentation, degré d'adhérence des écailles, éclat.
- Œil : teinte de la pupille, aspect de la cornée, affaissement de l'œil.
- Branchies : teinte, odeur, mucus.
- Rigidité : fermeté de la chair, fermeté de la paroi abdominale.
- Péritoine : adhérence à la paroi interne.
- Colonne vertébrale : couleur de la chair avoisinante, degré d'adhérence à la chair.
- Opercule : aspect.

Un panel d'experts composé de deux vétérinaires et d'un biologiste a examiné tous les échantillons. L'utilisation d'une fiche de résultats d'analyses organoleptiques nous a facilité le travail.

Cette appréciation organoleptique est effectuée afin de déterminer le temps de rejet organoleptique qui correspond au moment où le poisson n'est plus consommable et de mettre en évidence les modifications organoleptiques spécifiques à prendre en compte pour l'appréciation de l'altération de *Dicentrarchus labrax*.

8.2.2.2. Analyses bactériologiques

Les échantillons ont été analysés pour la recherche des germes de la flore mésophile aérobie totale à 30°C et de *Vibrio spp.*

Le nombre des bactéries de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) a été déterminé par la méthode de l'agar-agar (PCA) (Plate Count Agar). (ISO 4833).

Le muscle a été obtenu de manière aseptique et 25 g placés dans un sac Stomacher stérile contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). Ensuite, 1 ml de l'échantillon est introduit dans des boîtes de Pétri stériles, puis 10 à 15 ml de PCA préalablement fondu sont versés. Après mélange et solidification du mélange,

l'incubation est réalisée à 30 ° C pendant 48 à 72 heures. Seules les colonies blanches cultivées en profondeur sont considérées.

Pour *Vibrio spp.*, L'étape de pré-enrichissement a été réalisée en broyant 25 g d'échantillon dans 225 ml d'eau peptonée alcaline avec 2% de NaCl, puis incubé 24 heures à 41 ° C. Ensuite, les cultures ont été enrichies sur des plaques de gélose Thiosulfate, au citrate, à la bille et au saccharose (TCBS), et incubées à 37 ° C pendant 24 h.

8.2.2.3. Analyses chimiques

- **pH**

Le pH a été mesuré dans le muscle des échantillons de poissons en utilisant un pH-mètre de viande (Hanna Instruments). Meat PH Meter HI99163.

- **Dosage de l'ABVT par la méthode d'entraînement à la vapeur**

Le dosage de l'ABVT a été réalisé selon la méthode de distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide trichloracétique préconisé par la commission de l'Union Européenne (Directive UE 91/493). [96]

Pour obtenir un extrait de poisson exempt de protéines, on pèse 100g de muscle de poisson auquel on ajoute 200 ml de solution aqueuse d'acide trichloracétique à 7,5 % (TCA, Sigma-Aldrich). Après homogénéisation et centrifugation à 2000 tours/minute pendant 5 minutes, on filtre sur Bucher avec filtre Whatman n°3.

L'entraînement à la vapeur est réalisé avec un appareil de distillation de type Kjeldahl (Vapodest 2 Gerhardt).

On introduit 25 ml de filtrat dans le tube de distillation puis 6 ml d'hydroxyde de sodium à 10%. On place sous l'extrémité du condenseur un bécher dans lequel ont été versés 10 ml de solution aqueuse d'acide borique à 4% contenant 0,04 ml d'un indicateur mixte pour le titrage de l'ammoniac, constitué de rouge de méthyle et de vert de bromocrésol(Merck). On met en route la distillation et on prolonge l'entraînement à la vapeur jusqu'à ce que le bécher contienne exactement un

volume final de 50 ml (40 ml de distillat). L'appareil sera rincé avant l'utilisation suivante.

La solution d'acide borique étant devenue verte sous l'effet de l'alcalinisation produite par l'ABVT recueilli, on place le bécher sous une microburette graduée à 0,01 ml (ou une burette automatique) contenant une solution aqueuse d'acide sulfurique 0,1 N, et on titre jusqu'à complète décoloration (la chute de burette doit être lue précisément à ce stade, l'addition ultérieure d'une goutte d'acide sulfurique entraînera alors l'apparition d'une légère coloration rose).

Les valeurs d'ABVT sont calculées et exprimées en mg de d'ABVT/ 100 g de chair d'échantillon.



Figure 8.3: Appareil de Kjeldhal (LCI) Photo personnelle

- **Dosage de la TMA par la méthode d'entraînement à la vapeur**

La méthode de dosage de la TMA est assez proche de celle décrite pour le dosage de l'ABVT.

Cependant il existe une étape supplémentaire entre la déprotéinisation de l'échantillon et sa distillation : avant la distillation, on ajoute au filtrat 20 ml de formol (solution à 37% minimum) pour bloquer les amines primaires et secondaires. [97]

Les valeurs de TMA sont calculées et exprimées en mg de TMA / 100 g de chair d'échantillon.

Expression des résultats :

Le résultat s'exprime en mg d'azote pour 100 de chair applicable aussi bien pour l'ABVT et pour la TMA, à une décimale près.

Formule de calcul :

$$\begin{aligned} \frac{\text{ABVT}}{\text{TMA}} &= \frac{(V_1 - V_0) \times (m + V_{\text{ATCA}}) \times (M_N \times C_{\text{H}_2\text{SO}_4})}{V_i} \\ &= \frac{(V_1 - V_0) \times (100 + 200) \times (14 \times 0,1)}{25} \\ &= (V_1 - V_0) \times 16,8 \text{ (mg d'azote/ 100g de produit)} \end{aligned}$$

Soit :

V_1 = Volume d'acide sulfurique 0,1 N versé afin de neutraliser le distillat recueilli après distillation (ml).

V_0 = Volume d'acide sulfurique utilisé pour neutraliser le distillat « blanc » (ml).

M_N = Masse moléculaire de l'azote = 14 g/ mol.

$C_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = Concentration de l'acide sulfurique = 0,1 N.

V_i = Volume de la prise d'essai du filtrat (ml).

m = masse de l'échantillon (g).

V_{ATCA} = Volume d'acide trichloracétique ajouté à l'échantillon.

8.2.3. Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS suivant le programme ANOVA ($P < 0,05$), afin d'analyser les résultatsy compris le test de Student, ANOVA à uneet deux voies et le test de corrélation de Pearson, la comparaison des moyennes, les écarts types et les différences significatives. Les données sont présentées en moyenne \pm écart-type ($n = 3$).

8.3. Résultats

8.3.1. Analyse sensorielle

Les poissons classés dans la catégorie « Extra (E) » ont présenté une odeur agréable, un aspect général brillant, avec éclat métallique et reflets irisés, un corps rigide, arqué avec une consistance ferme et élastique.

Le poisson est humide avec un mucus transparent, les écailles sont fortement adhérentes et brillantes. La peau est tendue, bien colorée, bien adhérente, œil clair, vif, convexe, transparent, occupant toute la cavité orbitaire, l'opercule est adhérent, sans tache.

Branchies humides, brillantes, roses ou rouges sang. Abdomen Forme normale (ni gonflé, ni affaissé, ni tendu, ni déchiré) Pas de taches.

Viscères Lisses, propres, brillants, nacrés. Péritoine adhérent à la paroi de la cavité viscérale. Chair Ferme, blanche.

Les poissons classés dans la catégorie « Bonne (A) » ont présenté une perte d'éclat et de brillance, couleur plus fade et moins de différence entre la surface dorsale et ventrale, mucus cutané légèrement trouble, œil légèrement affaissé. Pupille enfoncée. Cornée légèrement opalescente. Les branchies ont une couleur moins vive, plus pâles sur les bords, avec un mucus transparent. Chair ferme et assez rigide, opercules argentés et teinté de rouge ou de brun, l'odeur des branchies est neutre.

Les poissons classés dans la catégorie « Acceptable (B) » ont présenté une peau terne, sans éclat. Couleurs délavées. Peau plissée lorsqu'on courbe le poisson, mucus cutané laiteux, œil plat, pupille voilée, Extravasations sanguines autour de l'œil. Les branchies s'épaississent, se décolorent, et présentent un mucus opaque. La consistance de la chair est un peu molle, présence des extravasations sanguines étendues au niveau des opercules. L'odeur des branchies est grasse, un peu sulfureuse, de lard rance ou de fruit pourri.

Les poissons classés dans la catégorie « Non Admet (NA) » ont présenté une odeur Désagréable, âcre, acide, ammoniacale, putride. Un aspect général mat, sans éclat ni reflets, un corps flasque, mou, avec une consistance molle, la pression des doigts

laisse des marques, présence des sécrétions gluantes. Ecailles soulevées se détachent facilement, la peau est décolorée et facilement déchirable, œil Terne, vitreux, opaque, concave, affaissé dans l'orbite, opercules Légèrement soulevés, avec des taches rouge brun. Branchies Sèches et grisâtres,

Abdomen flasque, déformé, souvent gonflé, avec des taches colorées (bleu foncé, verdâtre ou noirâtre). Viscères affaissés, gonflés. Péritoine fragile et en fin une chair friable, de coloration rouge ou plus ou moins brune, notamment le long de la colonne vertébrale.

Tous les poissons avaient une qualification Extra au moment de l'échantillonnage (tableau 8.1).

Tableau 8.1: Résultats de l'analyse sensorielle du bar (*Dicentrarchus labrax*) conservé sous glace issu de deux types d'élevage aquacole. E, extra; A, Bon; B, acceptable; NA, non-admis ou rejet.

Type d'élevage	Jours sous glace				
	0	6	8	13	15
Elevage dans des cages flottantes (Zemmouri)	E	A	A	B	NA
Elevage dans des étangs terrestres avec de l'eau chauffée (Dijnet)	E	A	B	NA	NA

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que les poissons (*Dicentrarchus labrax*) issus de l'élevage intensif en cages flottantes et en bassins d'élevage ont présenté une qualité « Extra (E) » entre le premier jour et le sixième jour du stockage sous glace. Par contre, les poissons issus des cages flottantes ont présenté une qualité « Bonne (A) » durant toute la période allant du sixième au treizième jour du stockage sous glace et une qualité « Acceptable (B) » du treizième jour de stockage jusqu'au jour de rejet organoleptique « Non admet (NA) » qui est le 15 jour, Alors que les poissons issus des bassins d'élevage ont présenté une qualité « Bonne (A) » seulement entre le sixième et le huitième jour du conservation sous glace et à partir du huitième jour et jusqu'au jour de rejet qui est le 13 jour, le poisson a présenté une qualité « Acceptable (B) ».(Tableau 8. 1)

8.3.2. Résultats bactériologiques

Nous avons déterminé le nombre de la flore mésophile aérobie totale à 30°C (FMAT), (Figure 8.4) et *Vibrio spp.* dans le bar élevé dans deux types d'élevage différents et conservé sous la glace.

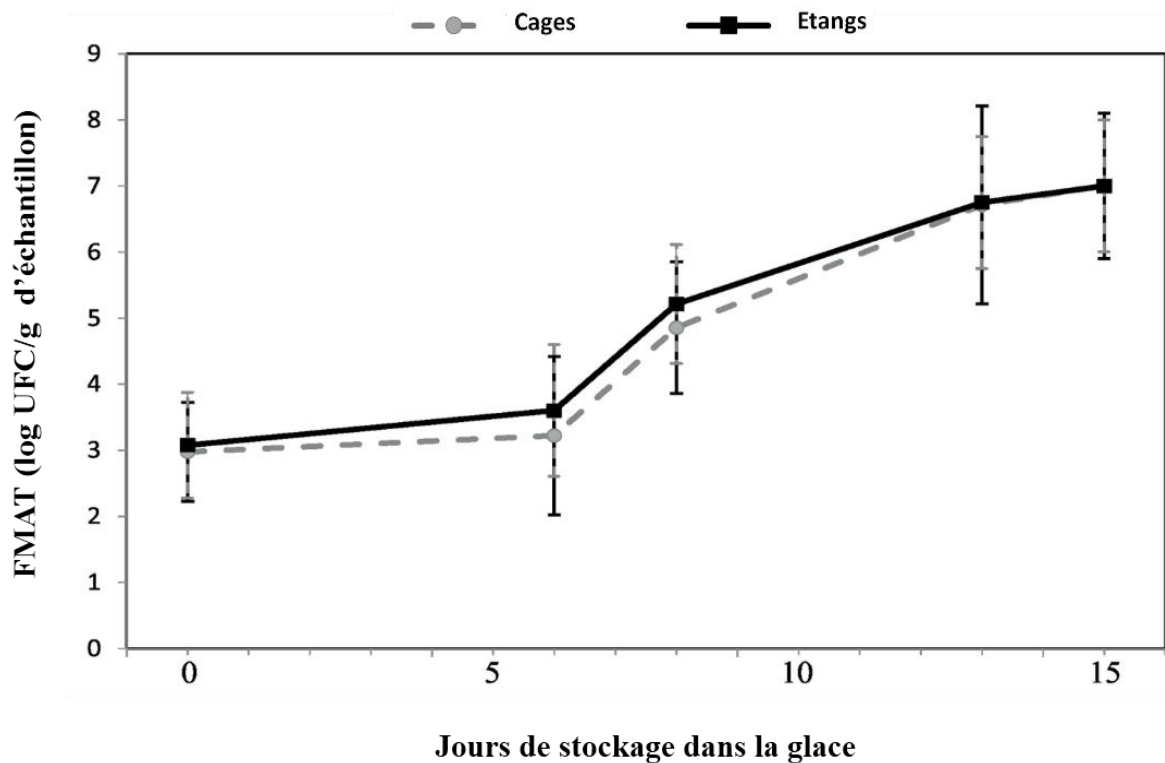


Figure 8.4 : Analyse microbiologique déterminant le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale à 30° C, en log UFC / g, à partir du Bar européen stocké dans la glace et élevé dans deux types d'élevages différents. Les données représentent la moyenne \pm écart type (n = 3).

Pour *Vibrio spp.* la croissance a été négative dans tous les échantillons. Les résultats de FMAT (flore mésophile aérobie totale à 30°C) montrent l'augmentation du nombre de bactéries le long du temps de conservation. Bien que les valeurs de FMAT soient toujours plus élevées chez les poissons élevés dans des étangs avec de l'eau chauffée de Dijnet, les différences n'étaient pas significatives par rapport aux cages flottantes de Zemouri. En fait, l'ANOVA à deux voies ne montre un effet

significatif qu'avec le facteur temps et aucune interaction entre la ferme et le temps n'a été observée (Tableau 8.4).

8.3.3. Analyses chimiques

Les résultats du pH et de la teneur en ABVT, TMA de *Dicentrarchus labrax* conservée sous glace à température entre 0 et 3°C) issus d'un élevage intensif dans des étangs, sont rapportés dans le tableau 8.2., et représentés par les figures 8.5., 8.7., 8.8., 8.9.

Tableau 8.2 : ABVT, TMA, pH du bar (*Dicentrarchus labrax*) issu d élevage intensif dans des étangs, conservé sous glace à 0-3°C°

Jours	J0	J6	J8	J13	J15
ABVT mgN/100g	15,29±0,78	24,83±0,88	27,1±1,56	35,2±2,33	39,18±0,95
TMA (mgN/100g)	0,54±0,066	1,07±0,08	2,35±0,96	3,37±0,22	4,77±0,4
pH	6,13±0,06	6,51±0,03	6,58±0,06	6,75±0,02	6,82±0,01

Jour de
rejet

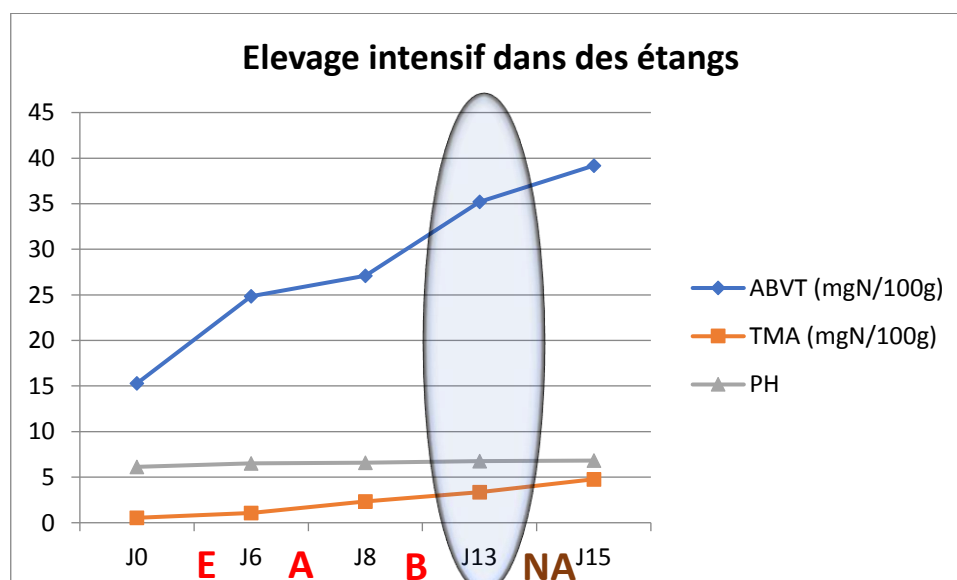


Figure 8.5: Evolution de l'ABVT, la TMA, le pH et la catégorie de qualité du bar (*Dicentrarchus labrax*) issu d élevage intensif dans des étangs, conservé sous glace à 0-3°C°

Au cours de la conservation sous glace (0 – 3°C) de *Dicentrarchus labrax* issus d'un élevage aquacole intensif dans des étangs, nous avons remarqué qu'à J0, le poisson est en très bonne qualité (catégorie Extra) avec un PH de $6,13 \pm 0,06$, teneur en ABVT de $15,29 \pm 0,78$ mgN/100g, et une teneur en TMA de $0,54 \pm 0,066$ mgN/100g. Jusqu'à J6 les poissons ne vont pas dépasser $24,83 \pm 0,88$ mgN/100g d'ABVT, $1,07 \pm 0,08$ mgN/100g de TMA et un pH de $6,51 \pm 0,03$, le poisson est classé en catégorie bonne.

A J8, nous avons enregistré une teneur en ABVT de $27,1 \pm 1,56$ mgN/100g et une teneur en TMA de $2,35 \pm 0,96$ mgN/100g, le PH marque une valeur de $6,58 \pm 0,06$ et le poisson est d'une qualité acceptable.

Au temps de rejet la teneur en ABVT et en TMA va dépasser respectivement les taux de $35,2 \pm 2,33$ mgN/100g et $3,37 \pm 0,22$ mgN/100g, un pH de $6,75 \pm 0,02$, à ce moment le poisson est considéré comme non admet, c'est le temps de rejet organoleptique.

Les résultats du pH et de la teneur en ABVT, TMA de *Dicentrarchus larax* conservé sous glace à température entre 0 et 3°C) issus d'un élevage intensif en cages flottantes sont rapportés dans le tableau 8.3., et représentés par les figure 8.5., 8.7., 8.8., 8.9.

Tableau 8.3 : ABVT, TMA, pH et catégorie de qualité du bar (*Dicentrarchus labrax*) issus d'élevage intensif en cages flottantes, conservé sous glace à (0 – 3°C)

Jours	J0	J6	J8	J13	J15
ABVT mgN/100g	$14,92 \pm 0,82$	$21,55 \pm 0,83$	$24,54 \pm 0,24$	$29,34 \pm 0,86$	$33,88 \pm 2,02$
TMA mgN/100g	$0,49 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,06$	$1,08 \pm 0,09$	$2,45 \pm 0,49$	$3,3 \pm 0,26$
pH	$6,08 \pm 0,01$	$6,42 \pm 0,05$	$6,57 \pm 0,02$	$6,67 \pm 0,03$	$6,75 \pm 0,05$

Jour de
rejet

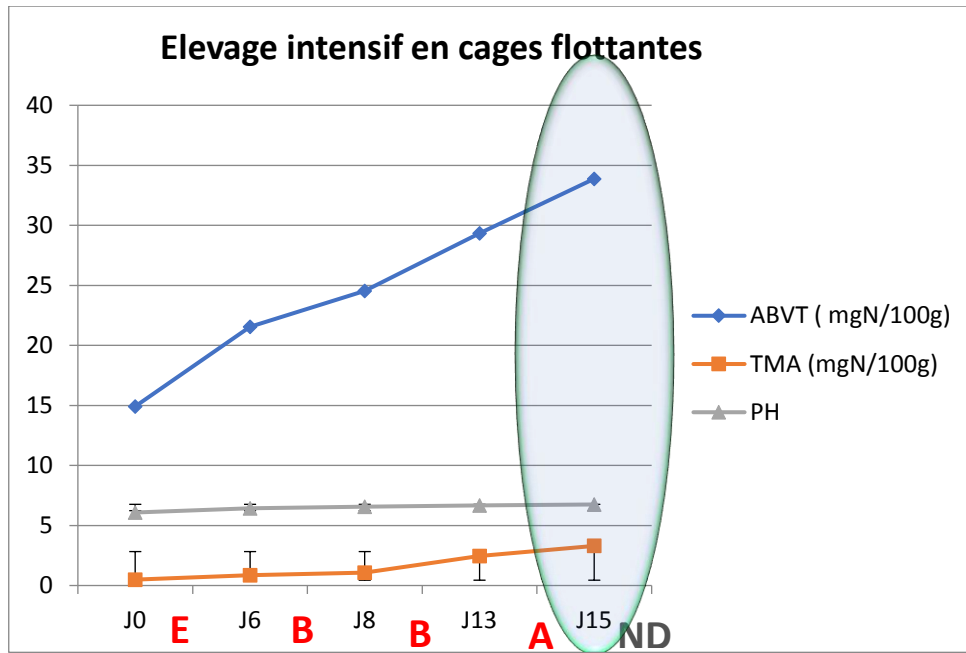


Figure 8.6 : Evolution de l'ABVT, la TMA, le pH et la catégorie de qualité du bar (*Dicentrarchus labrax*) issu d'un élevage intensif en cages flottantes, conservé sous glace à 0-3°C.

Au cours de la conservation sous glace (0 – 3°C) des poissons (*Dicentrarchus labrax*) issus d'un élevage aquacole intensif en cages flottantes, nous avons enregistré à J0, un pH de $6,08 \pm 0,01$, une teneur en ABVT de $14,92 \pm 0,82 \text{ mgN}/100\text{g}$, et une teneur en TMA de $0,49 \pm 0,06 \text{ mgN}/100\text{g}$. Le poisson est en très bonne qualité (catégorie Extra) Jusqu'à J6. Les poissons présentent une qualité bonne (A) de J6 à J13 et à partir de J13 le poisson présente une qualité acceptable (B) avec des teneurs d'ABVT, du TMA et du pH respectivement: $29,34 \pm 0,86 \text{ mgN}/100\text{g}$, $2,45 \pm 0,49 \text{ mgN}/100\text{g}$, $6,67 \pm 0,03 \text{ mgN}/100\text{g}$. Cette étape dure 2 jours pour arriver ensuite au temps de rejet au quinzième Jour (J15) qui montrent un taux d'ABVT de $33,88 \pm 2,02 \text{ mgN}/100\text{g}$, $3,3 \pm 0,26 \text{ mgN}/100\text{g}$ du TMA et un PH de $6,75 \pm 0,05$. A ce moment le poisson est considéré comme non admet.

Les paramètres chimiques analysés du pH de la chair, de l'ABVT et de la TMA du bar ont toujours augmenté de manière significative avec les jours de conservation et étaient aussi plus élevés chez les poissons de la ferme Dijnet.

Dans le pH de la chair, des différences significatives ont été observées entre les poissons des deux fermes après 13 jours ($P = 0,037$) et après 6 jours ($P = 0,067$) (Figure 8.7.). Cependant, l'ANOVA à double sens a montré qu'il n'y a pas d'interaction entre la source de la ferme et les facteurs de temps de conservation (Tableau 8.5.). En ce qui concerne les niveaux l'ABVT et de la TMA, lorsque les poissons des deux fermes sont comparés, les différences sont significatives après 6, 13 et 15 jours de conservation dans la glace. Dans les deux paramètres chimiques, l'analyse ANOVA à deux voies a révélé une interaction entre les deux facteurs (tableau 8.4.).

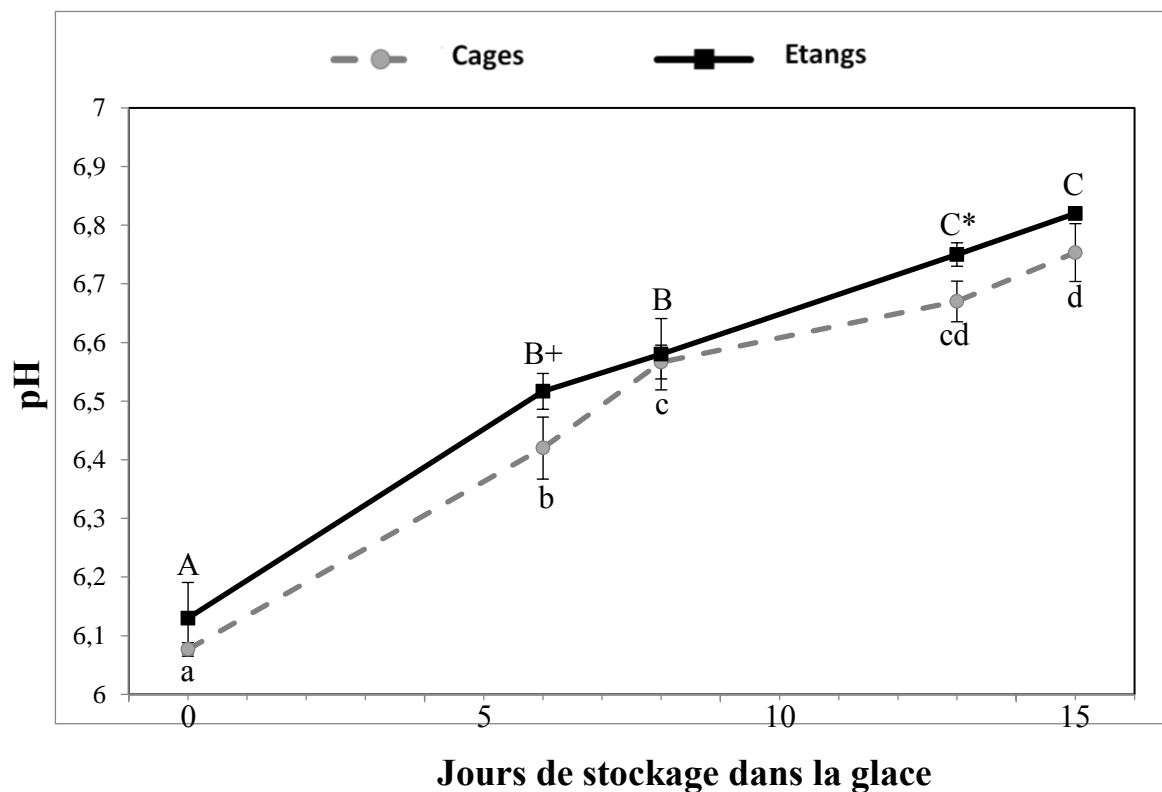


Figure 8.7 : Évolution du pH du bar stocké dans de la glace (0°C - 3°C) cultivée dans des étangs terrestres avec de l'eau chauffée ou des cages flottantes marines. Les données représentent la moyenne \pm écart type ($n = 3$). Différentes lettres majuscules ou minuscules indiquent des différences significatives ANOVA ($p \leq 0,05$) dans les types d'élevage de poissons respectivement, avec le temps de stockage. Les différences significatives entre les deux méthodes d'élevage à chaque fois sont également notées (test t; * $p \leq 0,05$; + $p \leq 0,1$).

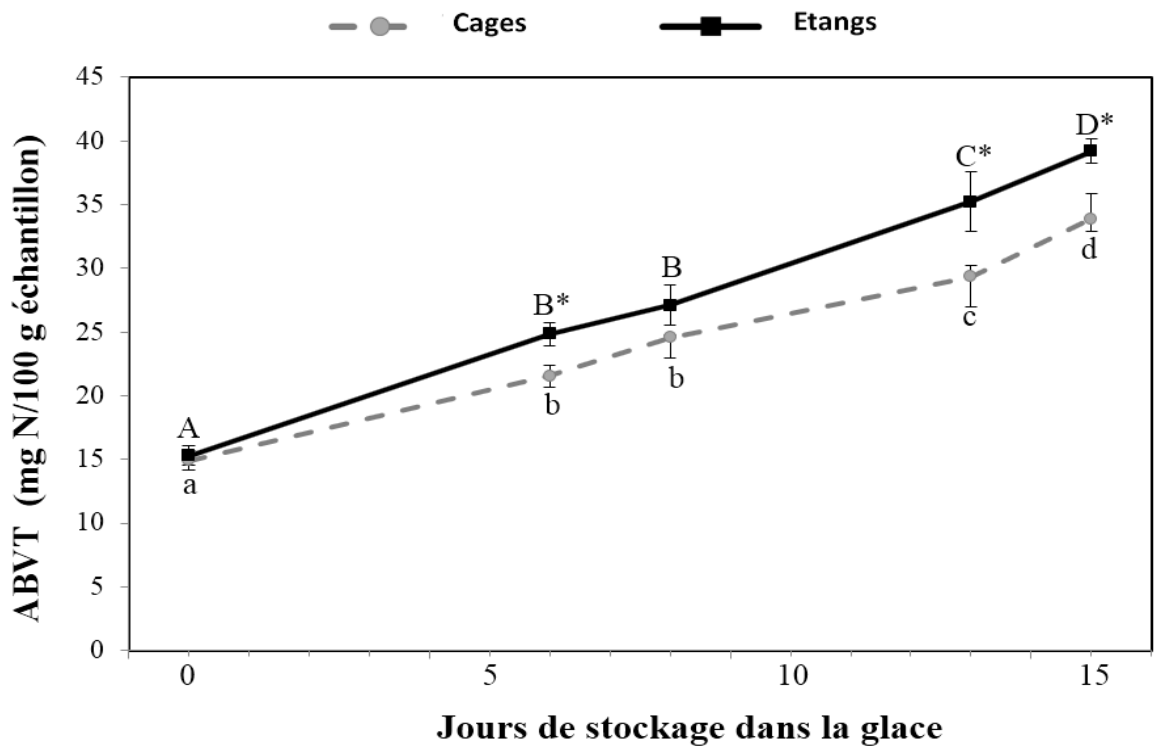


Figure 8.8 : Évolution d'ABVT dans le bar stocké dans la glace (0°C - 3 °C) cultivée en milieu terrestre dans des étangs avec de l'eau chauffée ou des cages flottantes marines. Les données représentent la moyenne \pm écart type ($n = 3$). Différentes lettres majuscules ou minuscules indiquent des différences significatives ANOVA ($p \leq 0,05$) dans les types d'élevages de poissons, respectivement, avec le temps de stockage. Les différences significatives entre les deux méthodes d'élevage à chaque fois sont également notées (test t; * $p \leq 0,05$).

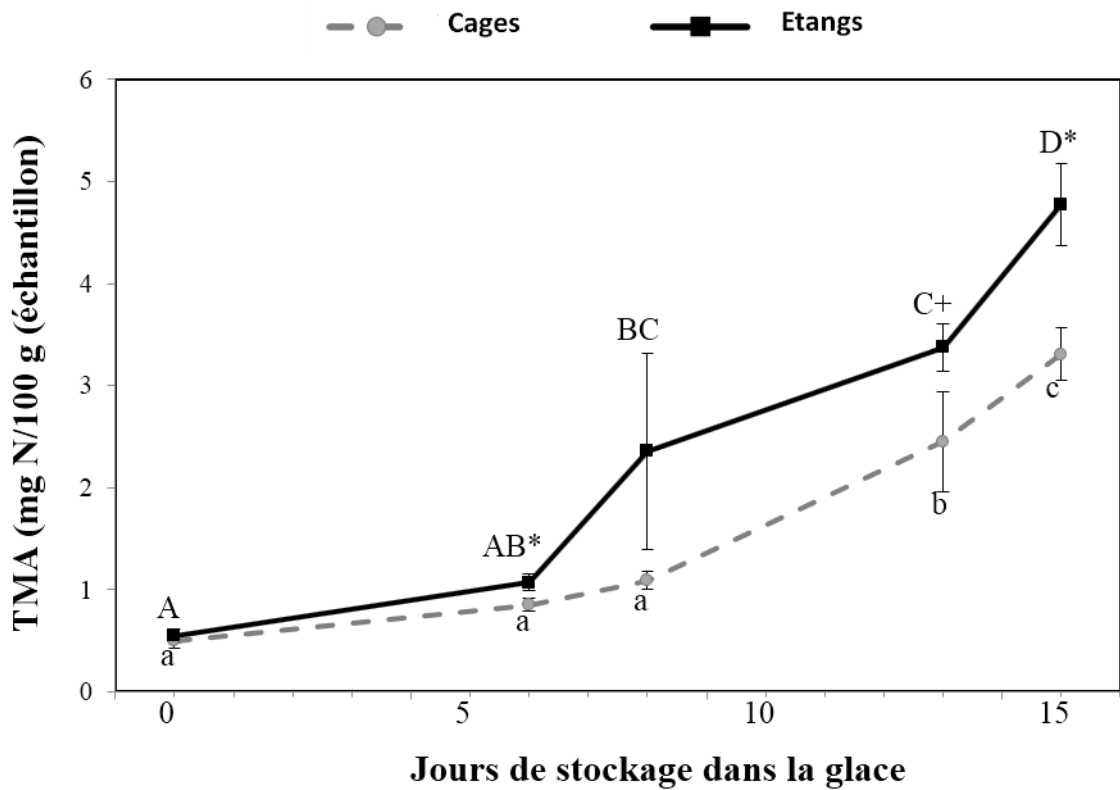


Figure 8.9 : Évolution de la TMA dans le bar stocké dans la glace (0°C - 3°C) cultivé en milieu terrestre dans des étangs avec de l'eau chauffée ou des cages flottantes marines. Les données représentent la moyenne \pm écart type ($n = 3$). Différentes lettres majuscules ou minuscules indiquent des différences significatives ANOVA ($p \leq 0,05$) dans les types d'élevages de poissons, respectivement, avec le temps de stockage. Les différences significatives entre les deux méthodes d'élevage à chaque fois sont également notées (test t; * $p \leq 0,05$).

Tableau 8.4: Analyse ANOVA bidirectionnelle des données obtenues du bar élevé dans deux types d'élevage différents et conservé sous glace. Des différences significatives ont été établies pour $P \leq 0,05$. FMAT flore mésophile totale à 30°C; ABVT, azote basique volatil total; TMA, triméthylamine.

Facteur	Paramètre analysé			
	FMAT	ABVT	TMA	pH
système d'élevage	0.845	0.000	0.000	0.000
Conservation sous glace	0.000	0.000	0.000	0.000
ferme x jour de conservation	0.999	0.010	0.015	0.471

Nous avons trouvé, des fortes corrélations positives entre le temps de conservation, et les données des résultats sensorielles, microbiologiques et chimiques (tableau 8.5).

Tableau 8.5: Corrélations observées entre les paramètres déterminés dans le bar européen. Le premier nombre correspond au coefficient de corrélation de Pearson et le second à la différence significative ($P \leq 0,05$).

Paramètres	ferme	Jours	Sensoriel	FMAT	ABVT	TMA
Jours	0.000 1					
Sensoriel	0.180 0.342	0.956 0.000				
FMAT	0.026 0.905	0.669 0.000	0.656 0.000			
ABVT	0.224 0.234	0.955 0.000	0.964 0.000	0.671 0.000		
TMA	0.178 0.137	0.870 0.000	0.920 0.000	0.706 0.000	0.942 0.000	
pH	0.127 0.503	0.963 0.000	0.928 0.000	0.538 0.007	0.955 0.000	0.845 0.000

8.4. Discussion

8.4.1. Appréciation organoleptique

L'examen organoleptique fait appel aux caractères sensoriels pour évaluer l'apparence, la texture, l'odeur et le goût.

Une telle démarche, bien qu'elle aboutisse à des résultats inévitablement subjectifs, est d'une grande importance pratique, car elle représente la base sur laquelle l'agent d'inspection et le consommateur averti acceptent ou rejettent le poisson.

L'appréciation organoleptique a permis de définir les temps de rejet organoleptique du bar (*Dicentrarchus labrax*) conservés sous glace à température de 0 à 3°C et issus de deux types d'élevage étudiés.

La durée de conservation est de 13 jours pour *Dicentrarchus labrax* issus d'élevage intensif en bassins, et elle est de 15 jours *Dicentrarchus labrax* issus d'élevage extensif.

La méthode sensorielle utilisée avait aussi pour but de déterminer les caractères organoleptiques, qui par leur spécificité et/ou leur répétabilité, peuvent constituer des critères fiables dans l'inspection qualitative de routine. A ce sujet, nous ne pouvons qu'émettre des observations qui attendront leur confirmation dans les études futures qui auront examiné plus spécialement et sur un nombre plus élevé d'échantillons.

Sur le bar (*Dicentrarchus labrax*), l'odeur des branchies et la cavité abdominale constituée est un critère potentiel à considérer. D'autres critères nous semblent intéressants à retenir comme les changements de la cornée des yeux et l'adhérence de la colonne vertébrale à la chair.

Un bar frais est brillant, assez raide, son œil est vif et sa bouche n'est pas forcément serrée, mais ferme.

Dans l'industrie de la pêche, l'évaluation sensorielle des poissons à la réception du produit est utilisée comme moyen de contrôle et de gestion de la qualité afin de s'assurer que les produits répondent aux espérances des acheteurs et des autorités

réglementaires. Le poisson est habituellement évalué entier avant transformation ultérieure.

L'évaluation sensorielle nécessite la mise en place et la formation de panel sensoriel ou d'inspecteurs entraînés. Pour éviter les erreurs d'appréciation, il est nécessaire de suivre les systèmes, les directives et les normes d'évaluations définis.

8.4.2. pH

Le pH est un paramètre important qui montre la diminution de la qualité de la chair de poisson durant la période de stockage. Le pH du muscle de poisson vivant est proche de la valeur 7.0 cependant le pH post mortem varie de 5,5 à 7,1 suivant la saison, les espèces et d'autres facteurs [98,99]. Un pH faible est utilisé comme un indicateur de stress au moment de l'abattage de beaucoup d'animaux. Un pH initial faible est associé avec une augmentation de stress à l'abattage [100]. C'est causé par la diminution des réserves énergétiques, principalement le glycogène, avec la production de lactate.

Puisque l'activité des enzymes dépend du pH, il affecte les réactions qui se déroulent pendant le stockage du poisson. Un pH relativement faible peut entraîner une diminution de liaisons d'eau dans les myofibrilles, affectant la diffusion de l'apparence du poisson. Un pH faible favorise aussi l'oxydation des myoglobines et des lipides [98]

En ce qui concerne notre travail aucune différence statistiquement significative du pH ($p < 0,05$) n'a été déterminée entre les poissons de *Dicentrarchus labrax* issus d'élevage intensif en bassins et les poissons issus d'élevage intensif en cage flottantes durant la période du stockage. Les valeurs du pH étaient de $6,13 \pm 0,06$ au début de stockage sous glace à $T^\circ 0 - 3^\circ\text{C}$, elles sont augmentées ensuite progressivement pour arriver à une valeur de $6,75 \pm 0,02$ le jour de rejet organoleptique chez les poissons issus d'élevage intensif en bassins.

Alors qu'elles étaient de $6,08 \pm 0,01$ à J0 et elles sont augmentées jusqu'à $6,75 \pm 0,05$ le jour de rejet organoleptique chez les poissons issus d'élevage intensif en cages flottantes.

Cette augmentation du pH indique l'accumulation des alcalines tels que les composés d'ammoniac et de TMA, principalement dérivé de l'action microbienne [101].

Le poisson est un très bon substrat pour la croissance bactérienne. Le poisson frais contient une proportion importante en eau. Il est riche en azote non protéique comme l'O.T.M.A. les glucides étant présents en faible proportion, une faible quantité d'acide lactique s'accumule après la mort. Cette acidification peu marquée (pH ultime de 6,5-6,8) permet une multiplication microbienne précoce. Le substrat le plus important pour l'activité métabolique des bactéries est la fraction hydrosoluble incluant l'O.T.M.A., les acides aminés libres et les nucléotides (I.M.P. et inosine). A partir de ces substrats, les bactéries produisent une série de composés volatils participant à l'altération comme le T.M.A., des composés sulfurés, de l'ammoniac, des aldéhydes et des cétones [34].

8.4.3. ABVT (Azote Basique Volatil Total)

La putréfaction résulte de l'action conjuguée des réactions de glycolyse, lipolyse et protéolyse. Chez le poisson, pour apprécier le niveau de dégradation, on s'intéresse davantage au catabolisme des substances protéiques, compte-tenu de sa pauvreté en glucides, de la complexité des lipides et de leur variabilité qualitative.

Sans vouloir négliger l'action des enzymes tissulaires, il apparaît que c'est essentiellement sous l'action des enzymes bactériennes que les protéines sont hydrolysées en peptides puis en acides aminés. Ceux-ci sont ensuite métabolisés selon 2 voies principales :

Les désaminations conduisant à l'ammoniac et à diverses chaînes hydrocarbonées, et les décarboxylations conduisant à la formation d'amines souvent volatiles et responsables de l'odeur spécifique des putréfactions [48].

Par ailleurs, de nombreuses bactéries peuvent, en l'absence d'oxygène, produire de la triméthylamine (TMA) en utilisant comme accepteur d'hydrogène l'oxyde de TMA, substance présente dans le tissu musculaire du poisson marin. Il se forme ainsi un certain nombre de composés azotés présentant en commun la basicité et la volatilité, dosables par acidimétrie après entraînement à la vapeur ou

microdiffusion. Cet ensemble, formé par l'ammoniac et diverses amines volatiles dont la triméthylamine, constitue l'azote basique volatil total (A.B.V.T.) [48].

Les résultats de notre étude, montrent que le dosage de l'ABVT ne peut rendre compte de l'évolution de la qualité de *dicentrarchus labrax* pendant les premiers stades de conservation. Par conséquent, il ne permet pas d'établir différentes classes de fraîcheur.

L'analyse statistique effectuée sur les résultats de l'ABVT obtenus dans les différents jours de conservation, montre qu'il n'existe pas de différences significatives ($p \geq 0,05$) entre *Dicentrarchus labrax* conservés sous glace à température entre 0 – 3°C, issus d'élevage intensif en bassin et *Dicentrarchus labrax* conservés sous glace à température entre 0 – 3°C, issus d'élevage intensif en cage flottantes.

Nos résultats montrent que :

Aux différents temps de rejet organoleptique et quelque soit le type d'élevage (en bassins ou en cage flottantes, les teneurs en ABVT de *Dicentrarchus labrax* se situent entre $33,88 \pm 2,02$ mgN/100g et $35,2 \pm 2,33$ mgN/100g de muscle.

8.4.4.TMA (Trimethylamine)

La TMA (produit de la dégradation ou de la réduction de l'OTMA « Oxyde de Triméthylamine » au cours de l'altération bactérienne) est un composé azoté volatil. La signification physiologique de la réduction de l'OTMA est qu'elle est un accepteur final d'électrons permettant la croissance anaérobie de certaines bactéries, même celles n'ayant pas une origine marine. Les microorganismes responsables de cette activité possèdent tous une « OTMA réductase ». Elles appartiennent à différentes familles ou genre bactériens : Enterobacteriaceae, *Vibrio parahaemolyticus*, *Alteromonas sp*, Campylobacter, Micrococcus et Flavobacterium [102].

Le niveau quantitatif de la TMA dans les poissons est considéré comme index important de la qualité des poissons de mer [103].

En ce qui concerne la TMA, dont la production est principalement associée à la présence d'*Alteromonas*, Bactéries *Photobacterium*, *Vibrio* et *Sewanella putrefaciens*, ses niveaux étaient très faibles, aussi rapportés par d'autres études

[95,104,92,93,91]. Ceci est lié à la faible teneur en oxyde de TMA dans le poisson et / ou à un faible niveau de bactéries productrices de H₂, principalement *S. putrefaciens*, qui n'a pas été déterminé ici. Cette production de TMA est, au moins dans cette étude, non produite par *Vibrio spp.* parce qu'ils n'ont pas été détectés dans cette partie de la présente étude.

L'analyse statistique effectuée sur les résultats de la TMA obtenus dans les différents jours de conservation, montre qu'il n'existe pas de différences significatives ($p \geq 0,05$) entre *Dicentrarchus labrax* conservés sous glace à température entre 0 – 3°C, issus d'élevage intensif en bassin et *Dicentrarchus labrax* conservés sous glace à température entre 0 – 3°C, issus d'élevage intensif en cage flottantes.

Aux différents temps de rejet organoleptique et quelque soit le type d'élevage (en bassins ou en cage flottantes, les teneurs en TMA de *Dicentrarchus labrax* se situent entre $3,3 \pm 0,26$ mgN/100g et $3,37 \pm 0,22$ mgN/100g de muscle.

Les résultats obtenus montrent que pour une même catégorie de fraîcheur nous avons obtenus des taux variable d'ABVT et de la TMA enregistrées au cours du stockage des poissons de *Dicentrarchus labrax* issus des deux types d'élevages et conservés sous glace à température entre 0 et 3°C

De même, nous avons remarqué que le poisson passe de la catégorie qualité Extra à la catégorie acceptable sans passer par la catégorie bonne dans l'élevage en bassins.

L'augmentation de la teneur en ABVT est attribuée à une croissance microbienne. En effet, il existe une forte corrélation entre la production des bases azotées et la multiplication bactérienne [105].

Les mêmes variations existent en ce qui concerne les teneurs en TMA, Ces variations expliquent la difficulté d'établir différentes classes de fraîcheur d'un point de vue teneur en ABVT, TMA mais il reste toujours que l'ABVT et la TMA sont des bons indicateurs de l'état d'altération du poisson. Elles permettent d'évaluer approximativement la qualité.

Ces résultats se concordent avec les résultats obtenus par François LEDUC en 2011 [52], qui a travaillé sur l'évaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques et qui a caractérisé le niveau de fraîcheur des poissons par la méthode QIM (Quality Index Méthod) et qui a montré que la dorade (*Sparus aurata*) et le bar *Dicentrarchus labrax* se conserve jusqu'à 15 jours sous glace à 4°C.

Deux méthodes de refroidissement différentes pour la daurade royale « *Sparus aurata* » et le bar « *Dicentrarchus labrax* » ont été utilisés par Kilinc, B., et al, en 2007[106] pour déterminer les effets de modes de glaçage sur la durée de conservation de ces deux espèces issues d'élevage aquacole : suspension de glace traitée et des flocons de glace traitée pour conserver la daurade dorade et le bar conservés à 4°C.

Pour la daurade et le bar la flore mésophile totale à 30°C a dépassé 7 log ufc / g (qui est considéré comme le niveau maximum d'acceptabilité pour l'eau douce et les poissons marins) après 13 jours pour les groupes des poisson conservés par des suspensions du glace à 4°C et 15 jours pour les groupe de poissons conservés par des flocons de glace à 4°C. Au jour 13 les valeurs d'ABVT des groupes conservés par des flocons de glace à 4°C ont atteint les limites légales fixées pour l'ABVT et pour la consommation humaine.

Selon les résultats d'analyses sensorielles, jusqu'au jour 13, tous les groupes des poissons analysés des deux espèces étaient « acceptable », mais, au jour 15, les poissons ne sont plus acceptables. [106]

Papadopoulos, Chouliara, Badeka, Savvaidis et Kontominas (2003) [93] ont déterminé l'effet de l'éviscération sur les aspects microbiologique, chimiques et sensorielles propre du bar d'aquaculture (*Dicentrarchus labrax*) conservé sous glace. Les résultats de cette étude étaient très semblables à nos conclusions en raison de l'augmentation d'ABVT et la valeur du pH en fonction du temps de stockage. Dans un autre rapport, la valeur du pH de merlu européen stockée avec des paillettes de glace a augmenté, passant de 6,67, 6,67 à 6,8 et 7,4 (jour 15), respectivement [107]. Des petites augmentations similaires ont aussi été rapportés pour le turbot (Pineiro, Vazquez, Perez-Diz, Gallardo, et Auborg, 2003 ; Rodriguez et al., 2003) [108,109].

8.4.5. Analyses bactériologiques

Les résultats bactériobiologiques du développement de la Flore Mésophile Totale à 30°C des poissons de *Dicentrarchus labrax* conservé sous glace à température entre 0 et 3°C issus de deux types d'élevage étudiés ont été jugés similaires à ceux rapportés dans la littérature pour le poisson stocké en conditions aérobies et sous modifié atmosphère modifié [110,111,112]. Jusqu'ici, les études se sont concentrées sur les analyses chimique et sensorielles plutôt que microbiologiques, avec des espèces de poissons en Méditerranée conservés sous glace [113,114].

En revanche, l'étude actuelle a montré une forte corrélation positive entre le pH, l'ABVT, la TMA et la flore mésophile aérobie totale, également trouvée par d'autres [92]. Cela suggère que la croissance bactérienne est responsable de la production de sous-produits alcalins qui augmentent le pH.

Pour l'aquaculture, le principal intérêt des eaux tièdes rejetées par les centrales électriques, réside dans le fait qu'elles peuvent contribuer à l'accélération de la croissance des organismes aquatiques, en effet ; pour la majorité des animaux aquatiques (mollusques, crustacés, poissons) l'ensemble des processus métaboliques est affecté directement par la température du milieu. L'élévation de la température accélère la croissance des animaux dans des limites propres à chaque espèce, faisant ainsi diminuer l'indice de consommation et permettant d'avoir une croissance optimale en tout temps, tant que la température du milieu est maintenue proche de l'optimum thermique de l'espèce élevée. [86]

D'un autre côté, l'utilisation de l'eau chaude d'une centrale électrique, n'est pas sans risques [86] :

- La température de l'eau rejetée suit celle du milieu naturel, ce qui implique qu'à une période de l'été, l'eau devient trop chaude et commence à avoir un impact négatif sur la croissance des espèces élevées. D'où la nécessité de prévoir une autre source d'eau plus froide, pour équilibrer la température.
- Le risque accru du développement de maladies : la température favorise leur développement.
- Risque de contamination des poissons par certaines espèces bactérienne spécifiquement marins.

La technique d'élevage peut causer la contamination du poisson s'il y a quelque chose d'incorrect dans la ferme elle-même, comme :

- La Mauvaise qualité de l'eau.
- Bassins inadéquats.
- Gestion et alimentation inadéquates (manque d'hygiène lors des différentes étapes d'élevage.
- Surpopulation.

Les résultats obtenus montrent que les poissons de *Dicentrarchus labrax* élevés en cages flottantes sur mer ont une durée de conservation supérieure à ceux qui sont élevés dans des étangs en béton et de l'eau réchauffé rejetée par une centrale électrique.

Le bar élevé en cage flottantes était moins exposé aux stress liés aux différentes manipulations et vivait dans des températures naturelles de l'eau de mer.

Le bar se conserve relativement bien sous glace à des températures de 0 à 3°C.

CHAPITRE 9

DISCUSSION GENERALE

Le bar européen est un poisson de grande valeur économique dans la région méditerranéenne. Parmi les pathologies bactériennes qui menacent cette espèce, principalement lorsqu'elles sont élevées à des densités importantes dans la pisciculture, la vibriose, la pasteurellose et la photobactériose qui entraînent des mortalités significatives et des pertes économiques très importantes. [19,21, 69,70] Et sont causés par des bactéries gram-négatives de la famille des Vibrionaceae. Les principaux agents bactériens identifiés de la famille des Vibrionaceae (bactéries gram-négatives) sont: *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. Harveyi*. [60,70,71]. Les maladies peuvent causer une mortalité significative dans les installations de pisciculture une fois qu'une épidémie est en cours et peuvent se propager rapidement lorsque les poissons sont confinés dans des systèmes commerciaux lourdement approvisionnés, et la morbidité peut atteindre 100% des établissements infectés. Ces bactéries produisent, des lésions et des ulcères cutanés très semblables à ceux observés dans nos échantillons. y compris l'érosion des nageoires et des opercules, des lésions ulcéraives hémorragique des petechies dans la peau au niveau des régions abdominale et thoracique, nous les attribuons à la maladie de type vibriose [60].

Nous avons effectué une caractérisation bactériologique classique dans des échantillons d'eau et de tissus de poissons. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas une forte présence de microorganismes dans l'eau. Cette constatation écarte la contamination par les travailleurs de la ferme aquacole et que la présence élevée de microorganisme est probablement due à la densité élevée de poissons et à la température élevée d'eau depuis que ceci est libéré d'une centrale électrique. De plus, l'analyse des tissus internes a révélé des microbiotes très semblables chez les poissons apparemment sains et malades. La caractérisation des bactéries par API20E nous a permis d'identifier *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis*. Cela rend difficile de déterminer l'agent étiologique réel produisant la maladie et constitue un handicap important dans les études sur le terrain. *V. Alginolyticus* constitue un envahisseur

opportuniste de tissus déjà endommagés, ou un faible pathogène du poisson stressé et a été isolé à partir de l'eau et / ou des tissus de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) [71,72].

Les poissons malades souffrent de lésions internes / externes qui peuvent modifier, la physiologie des poissons menant à la mort du poisson. Nous avons évalué certains marqueurs physiologiques des lésions tissulaires afin de déterminer les altérations métaboliques et physiologiques chez le loup de mer souffrant de la maladie de type vibriose. Ainsi, nous avons constaté que la plupart des paramètres métaboliques analysés étaient augmentés chez les poissons malades comparativement à des échantillons apparemment sains bien que seulement les niveaux de phosphore aient atteint un niveau significatif indiquant une altération du rein et de la nutrition. Plusieurs paramètres n'ont pas réussi à atteindre une signification probable en raison de la grande variabilité entre les spécimens qui pourrait être liée au temps différentiel exposé aux bactéries et / ou à l'histoire ou la durée de la maladie. Ainsi, ces données suggèrent une altération naissante des organes rénaux, musculaires, hépatiques et intestinaux, mais d'autres études sont nécessaires pour démontrer clairement si cela est réel ou non.

Nous avons également évalué certains aspects de l'immunité innée sanguine du bar souffrant d'une maladie de type vibriose.

Dans notre étude, nous avons trouvé peu de modifications dans les paramètres immunitaires humoraux innés évalués, sauf une diminution significative de l'activité bactéricide des poissons malades. Ce fait suggère que les poissons ne pouvaient pas contrôler l'infection bactérienne et d'expliquer les signes évidents de la maladie par rapport aux poissons apparemment en bonne santé, bien qu'ils montrent la présence d'environ les mêmes agents potentiellement pathogènes.

En ce qui concerne l'expression des gènes, nous avons également trouvé des données intéressantes sur l'immunité de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*). L'expression du marqueur de lymphocytes T (*tcrb*) a été augmentée à une mesure non significative dans le sang, ce qui suggère le manque d'adaptabilité cellulaire dans le poisson malade tandis que le marqueur pour le lymphocyte B (*igmh*) indiquant une réponse immunitaire humorale adaptative. Ces niveaux d'IgM

semblent ne pas être suffisants pour éliminer les bactéries. En revanche, le marqueur des granulocytes éosinophiles, mpx, a abouti à une régulation négative significative indiquant une éosinopénie. Cette constatation, en direction de la transcription vers le bas des molécules antimicrobiennes c3 et dic, pourrait expliquer la diminution de l'activité bactéricide dans le sérum et la sensibilité accrue des spécimens de poissons aux bactéries opportunistes menant à la maladie et aux mortalités observées.

Dans les infections contrôlées en laboratoire, par exemple, l'infection sub-létale du bar avec *V. anguillarum* a permis une régulation générale des gènes liés aux peptides antimicrobiens et aux gènes pro-inflammatoires cytokine il1b après moins d'un jour, mais habituellement non affectée après 72 h de l'infection dans les tissus immunitaires tels que la rate ou le rein [84].

Ainsi, l'immunité des poissons semble diminuer avec le progrès et la clairance de l'infection et pourrait expliquer en partie nos résultats chez les poissons avec un temps d'infection inconnu, mais toujours plus longue, les 72 h depuis les altérations externes sont tout à fait évidentes. D'autres études sont nécessaires pour évaluer la réponse immunitaire du bar des spécimens souffrant de pathologies naturelles.

Plusieurs méthodes, y compris sensorielles, microbiologiques et chimiques, sont disponibles pour évaluer la fraîcheur des produits de mer destinés à la consommation humaine. Les méthodes sensorielles appliquées aux poissons utilisent des caractéristiques organoleptiques pour évaluer l'apparence, la texture, l'odeur et le goût d'un produit en définissant les principales caractéristiques de la peau, du mucus, des yeux, des branchies et de l'abdomen. Cette approche, même si elle conduit à des résultats subjectifs, revêt une importance pratique et représente la base sur laquelle l'inspecteur accepte ou rejette le poisson.

Les données sensorielles de l'étude actuelle ont montré que tous les bars entreposés dans la glace étaient acceptables jusqu'à 8 jours. Après 13 jours, les poissons des étangs avec de l'eau chaude provenant d'une centrale électrique ont été jugés non admet à la consommation, et après 15 jours pour les poissons élevés dans des cages flottantes.

Les populations bactériennes vivant sur les produits de mer et leurs sous-produits sont les principaux facteurs responsables des changements chimiques dans les poissons conduisant à leur altération ; la flore mésophile aérobie totale et les paramètres chimiques montrent une corrélation positive et forte.

Le pH est l'un des paramètres chimiques les plus importants et les plus simples pour la détermination de la qualité des poissons pendant les périodes de stockage.

Chez le poisson vivant le pH du muscle est proche de 7, cependant le pH post mortem varie de 5,5 à 7,1 selon la saison, l'espèce et d'autres facteurs [98,99]. Un pH bas est utilisé comme indicateur de stress au moment du sacrifice du poisson puisque le stress produit augmente les niveaux de lactate et génère donc un pH acide, ce qui à son tour diminue l'organisation des myofibrilles et augmente l'oxydation de la myoglobine et des lipides [98]. Notre étude a montré que le pH du bar quand il a atteint la non-acceptation était de 6,75; c'est-à-dire, après 13 jours pour les poissons des étangs avec de l'eau chauffé et après 15 jours pour les poissons des cages flottantes.

En revanche, l'étude actuelle a montré une forte corrélation positive entre le pH, l'ABVT, la TMA et la flore mésophile aérobie totale, également trouvée par d'autres [92]. Cela suggère que la croissance bactérienne est responsable de la production de sous-produits alcalins qui augmentent le pH.

Dans les processus de dégradation du poisson, en raison des faibles niveaux de glucides, la complexité et la variabilité des lipides, de la glycolyse et de la lipolyse, respectivement, ils ont un faible impact, et la protéolyse est le facteur contributif le plus important. Cependant, hormis la dégradation enzymatique des protéines, l'action des enzymes bactériennes conduisant à la libération des peptides et les acides aminés semblent être plus pertinents. De nombreuses bactéries peuvent dégrader les protéines de poisson et produire de l'ammoniac et un grand nombre d'amines volatiles, qui sont responsables de l'odeur d'altération [48]. En outre, les bactéries sont capables de transformer la l'OTMA au TMA, ce qui contribue également à une odeur de poisson. Ainsi, le dosage de l'ABVT et de la TMA sont parmi les paramètres chimiques préférés pour déterminer l'état de fraîcheur ou d'altération des poissons.

Les données de l'étude actuelle ont montré initialement de faibles niveaux de l'ABVT et de la TMA dans le bar frais, leur taux augmente avec le temps de stockage, toujours plus haut dans le bar cultivé dans des étangs avec de l'eau chauffée.

Dans l'étude actuelle, l'altération du bar a été observée à des valeurs d'ABVT et de la TMA plus élevées : 33 et 3,7 mg / 100 g d'échantillon, respectivement. En ce qui concerne les limites établies pour l'ABVT, des valeurs de 35 mg N / 100 g (décision CEE 2074 /2005) [115] ou de 25 mg N / 100 g [116] ont été proposées comme le début de la détérioration pour le bar entier et tranché, respectivement. Ainsi, les données de l'ABVT de notre étude concordent avec les limites du CEE et la plupart des rapports pour le bar [95,104,92,93,91]. En ce qui concerne la TMA, dont la production est principalement associée à la présence d'*Alteromonas*, Bactéries *Photobacterium*, *Vibrio* et *Sewanella putrefaciens*, ses niveaux étaient très faibles, aussi rapportés par d'autres études [95,104,92,93,91]. Ceci est lié à la faible teneur en oxyde de TMA dans le poisson et / ou à un faible niveau de bactéries productrices de H₂, principalement *S. putrefaciens*, qui n'a pas été déterminé ici. Cette production de TMA est, au moins dans cette étude, non produite par *Vibrio spp.* parce qu'ils n'ont pas été détectés dans cette partie de la présente étude.

Il existe une controverse à propos des limites de TMA. Ainsi, les niveaux de rejet de poissons ont été proposés à 10-15 mg de TMA / 100 g (Huss, 1995) [117], et établi à 4 mg de TMA / 100 g (Kostaki et al., 2009) [104], 5 mg de TMA / 100 g (Masniyom et al., 2002; Özden et al., 2007) [116, 118] et 8 mg de TMA / 100 g pour le bar (Kilinc et al., 2007) [106] . Comparativement, la limite inférieure de la TMA observée dans la présente étude, soit environ 3,3 mg de TMA / 100 g, pourrait être attribuable à une diminution du nombre de bactéries et probablement à un faible nombre de bactéries productrices de H₂, qui devraient être vérifiées. Cependant, bien que certains auteurs (Cakli et al., 2006, Papadopoulos et al., 2003) [95,93] n'aient pas proposé le TMA comme un bon marqueur de la qualité du poisson après le stockage de glace, les données de l'étude actuelle les contredisent.

Conclusion

Le bar européen ou loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) élevé dans des étangs avec de l'eau chauffée a montré une prévalence élevée de spécimens avec des ulcères cutanés et des lésions ressemblant à une maladie de type vibriose. L'examen microbiologique a montré une charge et une diversité très semblables de bactéries dans les tissus provenant de poissons malades apparentés à la vibriose et de *G. hollisae* les seules bactéries présentées différemment dans des spécimens de poissons malades.

En ce qui concerne les paramètres métaboliques étudiés de loup de mer, seuls les niveaux de phosphore étaient élevés chez les poissons malades. D'autre part, l'immunité du sang a entraîné une diminution de la transcription du marqueur des éosinophiles (mpx) et des peptides antimicrobiens (c3 et dic) ainsi que de l'activité bactéricide totale, favorisant la croissance bactérienne des pathogènes opportunistes et donc de la maladie.

D'autres études pluridisciplinaires sont nécessaires pour montrer comment l'élevage et la culture intensive de poisson avec de l'eau chauffée favorise l'apparition et l'incidence des agents pathogènes.

Le présent travail avait aussi pour but de déterminer la durée de conservation sous glace à température entre 0 et 3°C des poissons du bar (*Dicentrarchus labrax*) issus de deux types d'élevage aquacole intensif par l'évaluation organoleptique, chimique (pH et teneur en ABVT, TMA) et microbiologique.

Il s'agit de deux types d'élevage :

Un élevage dans des étangs terrestres avec de l'eau chaude provenant d'une centrale électrique (Ferme ONDPA Djinet) ; et un élevage dans des cages flottantes sur mer (ferme Hypone aquacole de Zemmouri), les deux élevages se situent dans la wilaya de Boumerdes en Algérie.

La durée de conservation sous glace à température entre 0 et 3°C des poissons de *Dicentrarchus labrax* issus d'élevage aquacole intensif des étangs terrestres avec de l'eau chaude provenant d'une centrale électrique était de 13 jours, alors qu'elle est de 15 jours pour les poissons de *Dicentrarchus labrax* issus d'un élevage intensif en mer dans des cages flottantes.

Le dosage de l'ABVT et de la TMA est également un critère important à étudier, quoiqu'il ne renseigne pas sur les stades précoces de fraîcheur, néanmoins, il reste fiable pour différencier entre un poisson frais et un poisson altéré.

L'évolution de l'altération et la limite d'acceptabilité organoleptique coïncident bien avec les résultats du dosage de l'ABVT et de la TMA et du pH.

Le suivi chimique montre que les paramètres, pH Azote Basique Volatil Total (ABVT) et triméthylamine (TMA) constituent des indices appropriés pour l'évaluation de l'altération des poissons de *Dicentrarchus labrax*.

L'évolution de l'altération et la limite d'acceptabilité organoleptique coïncident bien avec les résultats du dosage de l'ABVT et de la TMA.

La charge de la Flore Mésophile Aérobie Totale à 30°C (FMAT), le pH, les teneurs en Azote Basique Volatil Total (ABVT) et en Triméthylamine (TMA) étaient toujours plus élevés chez les poissons élevés dans des étangs terrestres.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les poissons de *Dicentrarchus labrax* élevés en cages flottantes sur mer ont une durée de conservabilité supérieure à ceux qui sont élevés dans des bassins en béton et de l'eau réchauffé rejetée par une centrale électrique. Le loup de mer élevé en cage flottantes était moins exposé aux stress liés aux différentes manipulations et vivait dans des températures naturelles de l'eau de mer. Le bar se conserve relativement bien sous glace à des températures de 0 à 3°C.

L'étude actuelle a démontré que le bar qui était élevé dans des étangs avec de l'eau chauffée montre un pH, un ABVT et de la TMA significativement plus élevé lorsqu'ils sont stockés dans la glace par rapport à ceux élevés dans des cages flottantes en pleine mer coïncidant avec un rejet précoce par analyse sensorielle. Cette étude démontre que non seulement la méthode de stockage affecte la fraîcheur et la qualité des produits de la pêche mais aussi l'environnement et les conditions d'élevage de pisciculture.

La présente étude a permis également de dégager par l'examen sensoriel, certains caractères organoleptiques, qui semblent être intéressants à retenir pour l'inspection des poissons de *Dicentrarchus labrax*.

Le type d'élevage peut influencer sur la durée de conservation du poisson. La Mauvaise qualité de l'eau, et les bassins inadéquats (manque d'hygiène, surpopulation) causent la contamination du poisson.

Recommandations et perspectives

La prophylaxie des élevages aquacoles débute par la mise en place d'un cadre réglementaire adapté qui puisse être utilisé pour éviter l'introduction et la propagation, chez les poissons, des pathologies graves ayant un impact socio-économique important et représentent un risque permanent pour les poissons d'aquaculture et pour les consommateurs.

En plus de l'optimisation des paramètres environnementaux pour réduire les facteurs pathogènes liés aux stress, il existe d'autres facteurs importants à prendre en compte :

- densité optimale des poissons pour éviter le stress dû à la surpopulation.
- réduction des stress dus aux manipulations ou à d'autres causes.
- la vaccination est l'une des mesures préventives les plus efficaces pour éviter les pathologies infectieuses.
- La formation du personnel à l'hygiène est essentielle et indispensable. Les moyens de maîtrise de plusieurs risques retenus passent par le respect scrupuleux de ces règles d'hygiène. Les implications pour la santé publique et les conséquences économiques doivent être expliquées clairement au personnel.

Enfin, les attentes grandissantes des consommateurs vis-à-vis de la qualité des produits de la pêche et d'aquaculture doivent faire réfléchir les autorités et les professionnels de la filière pêche sur la nécessité de mettre en place des démarches qualité fondées sur une analyse au préalable des risques et des points de contrôle pour leurs maîtrises, notamment le système HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point ou Analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise. Ces efforts ne doivent pas répondre uniquement aux obligations réglementaires, mais aussi aboutir à la mise sur le marché de produits sains, frais, et de grande qualité.

APPENDICE

A. LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ABVT :	Azote Basique Volatil Total
AB:	Acides biliaires
AU:	Acide urique
ADP :	Adénosine diphosphate
AFNOR :	Association Française de Normalisation
AGPI :	Acide gras polyinsaturés
ALB:	Albumine
AI :	Amine Index
AMP :	Adénosine monophosphate
ANP :	Azote non protéique
alp :	Phosphate alcaline
AST:	Aspartate aminotransférase
ATP :	Adénosine tri-phosphate
C₃ :	Complément composant 3
Ca ++:	Calcium
CE :	Communauté européenne
CEE :	Communauté Economique Européenne
CK:	Créatine kinase
dic :	Dicentracin
DMA :	Diméthylamine

ef1a :	Facteur d'allongement 1
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GLOB:	Globuline
GLU:	Glucose
HACCP:	Hazard Analysis Critical Control Point
Hamp:	Hepcidine
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography
Hx:	Hypoxanthine
ICMSF:	International Commission on Microbial Specifications for Foods
igmh :	Chaîne lourde d'immunoglobuline M
il1b:	Interleukine 1 β
IMP :	Inosine monophosphate
INO :	Inosine
ITSV :	Informations Techniques des Services Vétérinaires Français
LCI :	Laboratoire Central de l'Intendance
Lys :	Lysozyme
MPRH :	Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques
mpx :	Eosinophilperoxidase like
NH₃ :	Ammoniac
OTMA :	Oxyde de triméthylamine
PCR :	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PCRq :	PCR quantitative ou en temps réel
PHOS:	Phosphore

K⁺:	Potassium
PT:	Protéine totale
QIM:	Quality Index Method
tcrb:	β sous unite du recepteur des cellules T
TMA:	Triméthylamine
UFC :	Unités Formant Colonies

B. Activité antiprotéase (sérum)

- 10 ul de sérum + 10 ul de trypsine (incuber 10 min à température ambiante)
- Ajouter 100 ul de bicarbonate d'ammonium + 125 ul d'azocaséine 2% dans du bicarbonate d'ammonium (en eppendorf)
- Incuber 2 heures à température ambiante
- Ajouter 250 ul de 10% de TCA
- Incuber 30 min à température ambiante
- Centrifuger à 6000 g, 5 min
- Passer 100 ul à la plaque et ajouter 100 ul de NaOH (1N)
- Lire à 405 ou 450 nm

Contrôle positif : 10 ul de bicarbonate d'ammonium + 10 ul de trypsine (laisser incuber 10 min avec de la trypsine) (100% de protéase et 0% d'activité antiprotéase).

Contrôle négatif : 10 ul de bicarbonate d'ammonium + 10 ul de bicarbonate d'ammonium (0% de protéase et 100% d'activité antiprotéase)



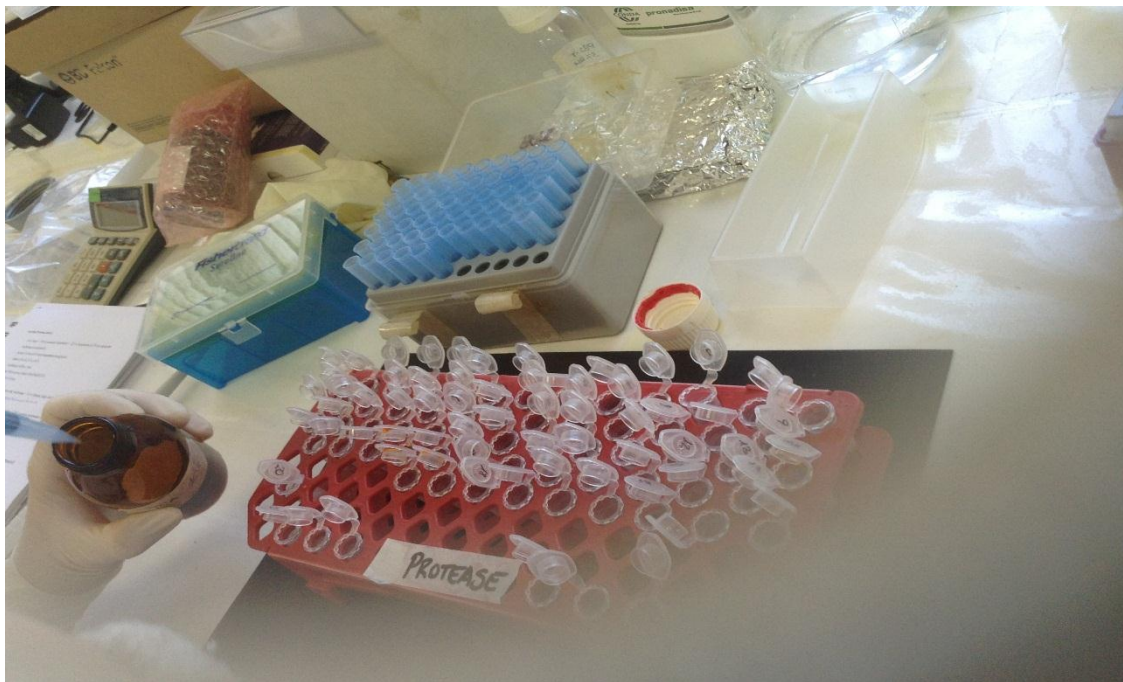
Recherche de l'activité antiprotéase

C. Activité protéase (sérum)

- 10 ul de sérum + 100 ul de bicarbonate d'ammonium + 125 ul d'azocaséine 2% de bicarbonate d'ammonium (in eppendorf)
- Incuber 24 heures à température ambiante
- Ajouter 250 ul de 10% de TCA
- Centrifuger à 6000 g, 5 min
- Passer 100 ul à la plaque et ajouter 100 ul de NaOH (1N)
- Lire à 405 ou 450 nm

Contrôle positif : 100 ul de bicarbonate d'ammonium + 10 ul de trypsine (laisser incuber 10 min avec de la trypsine) (100% de l'activité protéase)

Contrôle négatif : 100 ul de bicarbonate d'ammonium + 10 ul de bicarbonate d'ammonium (0% d'activité protease).



Recherche de l'activité protéase



Recherche de l'activité antiprotéase et protéase

D. Activité Peroxydase (sérum)

1. Dans les plaques à 96 puits, mettre ce qui suit :
 - 5 μ l de sérum + 45 μ l de tampon Hanks sans calcium ni magnésium (en triple pour chaque poisson).
2. Ajouter 100 μ l de la solution de TMB (10mM) et de H₂O₂ (0,015%) :
 - 40 ml d'eau distillée + 10 μ l H₂O₂+ 1 comprimé de TMB.
3. Arrêtez la réaction avec 50 μ l de H₂SO₂ 2M.
4. Mesurer l'absorbance à 450 nm



Préparation des plaques



Lecteur des plaques

E. Extraction d'ARN par Trizol®

- Mettre les échantillons sur de la glace (décongélation).
- Ajouter 500 µl de Trizol® aux échantillons.
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 100 µl de chloroforme (200 µl par ml de Trizol®).
- Agiter fortement pendant 15 secondes.
- Incuber 3 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 12000g pendant 15 minutes à 4 ° C.
- Récupérer la phase aqueuse (300 µl environ) et mettre un nouvel eppendorf.
- Ajouter 250 µl d'isopropanol (500 µl par ml de Trizol® initial)
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Laisser à - 20 ° C, 30 minutes.
- Centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes à 4 ° C.
- Retirer le surnageant.
- Laver en ajoutant 500 µl d'éthanol froid à 75%.
- Centrifuger à 7000 g pendant 10 minutes à 4 ° C.
- Retirer le surnageant.
- Laver en ajoutant 500 µl d'éthanol froid à 75%.
- Centrifuger à 7000g pendant 10 minutes à 4 ° C.
- Retirer le surnageant.
- Laisser sécher le culot 5-10 minutes à température ambiante
- Remettre en suspension dans 30 µl de H₂O + DEPC chauffé à 60 ° C.
- Quantification en Nanodrop (d'abord un blanc dans 2 µl d'eau DEPC puis 2 µl de chaque échantillon). [ng / ul].
- Enregistrer l'ARN à - 80 ° C

F. Purification de l'ARN avec DNase I

Préparer l'ependorf (500 μ l ou 250 μ l, selon le thermocycleur à utiliser).

Remplir jusqu'à 8 pi avec de l'eau distillée DEPC pour préparer 1 μ g.

Préparer un mélange avec: + 1 μ l de tampon 10 x par échantillon.

+ 1 μ l de DNase I par échantillon.

Incuber dans un thermocycleur à 37 ° C 30 minutes.

Ajouter 1 μ l d'EDTA 0,5 et pH 8 (arrêter la réaction DNase).

Incuber dans un thermocycleur 10 minutes à 65 ° C.

G. Retrotranscription ARNm

Décongeler tous les réactifs.

Sur chaque échantillon précédent, nous avons ajouté 2 μ l d'un mélange avec:

+ 1 μ l d'Oligo dT

+ 1 μ l de dNTP

Incuber dans le thermocycleur pendant 5 minutes à 65 ° C.

Incuber 1 minute sur de la glace.

Ajouter 7 μ l du mélange :

4 μ l de tampon 5x.

1 μ l de DTT.

1 μ l de H₂O + DEPC.

1 μ l de SuperScript III (rétrotranscriptase)

A ce volume de 20 μ l par échantillon, une impulsion de centrifugeuse est donnée.

Mettez dans le thermocycleur :

50 ° C, 10 minutes.

80 ° C, 10 minutes.

Compléter avec de l'eau distillée stérile.

Congeler des échantillons d'ADNc à - 20 ° C.



Thermocycleur

H. Article

Aquaculture 490 (2018) 120–124



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Fish farming conditions affect to European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) quality and shelf life during storage in ice

Djamal Mokrani^{a,c}, Mustapha Oumouna^b, Alberto Cuesta^{c,*}^a University of Blida 1, Institute of Veterinary Sciences, Blida, Algeria^b Faculty of Natural Science and Life, University Dr. Yahia Fares, Medea, Algeria^c Fish Innate Immune System Group, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Dicentrarchus labrax
Aquaculture
Sensory analysis
Chemical analysis
Bacteriological analysis

ABSTRACT

Seafood rapidly deteriorates; storage by cooling in ice is a common technique for prolonging its freshness and quality. The current study compared the shelf life and quality of ice-preserved European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sourced from two different intensive fish farming systems: terrestrial ponds using heated water from a power plant and floating cages in the open sea. Using sensory analysis, the fish cultured in the heated water ponds were rejected as unacceptable for consumption after 13 days, while the fish reared in the floating cages were rejected after 15 days. Total viable counts of aerobic bacteria, pH, total volatile basic nitrogen and trimethylamine levels were consistently higher in the fish cultured in heated water ponds. Chemical, bacteriological and organoleptic acceptability demonstrated that fish rearing conditions were important for storage and needs to be taken into consideration for fish management and processing.

1. Introduction

The quality of whole fish or fillets is inseparable from the notion of freshness for the commercialisation of fish. To meet consumer's demands, the fish product must have characteristics similar to that of freshly caught fish. From the time of capture, depending on the fish species, fish products deteriorate rapidly as a result of high water activity, neutral or low pH, relatively large quantities of free amino acids, the presence of autolytic enzymes and a high per cent of unsaturated fatty acids; these factors are greatly accelerated by microbial growth (Duan et al., 2010; Mazandrani et al., 2016). Although not definitive, one of the most commonly used ways to preserve fish is storage in ice, though it does not avoid deterioration. The alteration phenomena are unavoidable and occur in fish products in much shorter periods compared with foods of animal origin. Several techniques have been selected by industry professionals to monitor the loss of freshness, including sensory, biochemical, physical and microbiological methods (Oehlenschläger, 2014). Currently, sensory analysis is very useful and the most used indicator of freshness and quality of fish and fishery products by the seafood industry, authorities and consumers (Bernardi et al., 2013; Oehlenschläger, 2014). Microbiological analyses as well as biochemical methods to measure chemical alterations, including bacteria-produced metabolites, such as pH, total volatile basic nitrogen

(TVB-N), trimethylamine (TMA) and thiobarbituric acid (TBA) are widely used and very powerful for checking seafood quality (Dalgaard, 2015; Parlapani et al., 2015). However, TVB-N and TMA only increase in fish during the late stages of storage, and the very low levels of TMA precursors in Mediterranean fish species need to be considered as a limitation of these biochemical characterisation of fish freshness (Castro et al., 2006; Oehlenschläger, 2014; Parlapani et al., 2014). Therefore, the use of sensory, microbial and chemical analysis in combination allows a better definition of the alteration and therefore better control of storage.

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is probably the most important farmed marine fish species in the Mediterranean region and has high economic value. Sea bass are mainly demanded by consumers as whole fish, gutted or not, but the use of sliced ready-to-use flesh is also becoming popular. The sea bass flesh is appreciated by consumers because of its white colour, sweet and mild flavour and low fat content. After capture, either wild or cultured, sea bass spoilage depends on the storage method and chilling in ice is a preferred method. Several studies have documented the shelf life of farmed sea bass over 8 to 19 days dependent on the chilling temperature (Cakli et al., 2006; Kyra and Lougovois, 2002; Paleologos et al., 2004; Papadopoulos et al., 2003). However, no information currently exists regarding how farming conditions or fish origin can affect fish deterioration.

* Corresponding author at: Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.
E-mail address: alcuesta@um.es (A. Cuesta).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.032>

Received 2 May 2017; Received in revised form 14 December 2017; Accepted 21 February 2018

Available online 23 February 2018

0044-8486/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Algeria has been trying for many years to diversify its aquaculture. The current trend is to improve marine fish farming of European sea bass and gilthead seabream (*Sparus aurata*) (FAO, 2014; Feidi, 1998). The fisheries and fish farming sectors are strategic in Algeria because of its ability to contribute to the emergence of a national and productive economy, the creation and preservation of jobs and the enhancement of the country's food security (Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques, 2014). The most common fish production technologies in that country are cages in coastal areas and terrestrial ponds. Currently, Algeria's marine fish farming industry comprises one floating aquaculture fish farm and terrestrial ponds with heated water coming from a power plant.

The current study aimed to examine the quality and freshness during ice-storage of European sea bass produced from two different farming regimes: marine floating cages and terrestrial ponds with heated water. Therefore, sampled fish, whole and un-gutted, were stored in ice at temperatures of 0 °C–3 °C. Sensory parameter, microbiological and chemical (pH, TVB-N and TMA) analyses of sample fillets were performed until 15 days. The implication of the farming conditions and management on fish freshness were considered in light of the results.

2. Material and methods

2.1. Sampling

The current study was conducted on European sea bass (*D. labrax*) reared in two different types of installations: intensive farming in floating cages and intensive livestock rearing in ponds using heated water from a power plant. The farms are separated by 16 km and located in the vicinity of Algiers, Algeria. During sampling, in September 2014, the air temperature was 31 °C and the water temperature was 24.5 °C and 28 °C for the cages and heated-water pond installations, respectively.

Forty-five specimens (210–240 g body weight) per farm, from three different cages/ponds, were sampled on the same day, and whole and un-gutted specimens were immediately stored in ice (0 °C–3 °C). The samples were transported to the Central Laboratory, Stewardship of the National People's Army, Algeria. The fish were preserved for up to 15 days; melted water was removed by draining, and the temperature was checked every 3 h and maintained between 0 °C and 3 °C. Three fish per farm were randomly taken immediately, 0 days, or at 6, 8, 13 and 15 days after sampling and analysed separately.

2.2. Sensory analysis

The sensory analysis used in this study was based on the description of different characteristics selected by the method of the European Economic Community (CEE) No 2406/96 (Table 1). An expert

assessment panel was composed of three assessors; they made blind and independent evaluations of three fish per farm and sampling time and recorded the data on forms. The organoleptic evaluation determined the time of organoleptic rejection, when the fish was not edible based on the characters observed and described in Table 1.

2.3. Bacteriological analysis

Three independent fish samples per farm were analysed in duplicate for the presence of total aerobic bacteria and *Vibrio* spp. Total viable count (TVC) of aerobic bacteria was determined by the plate count agar (PCA) method (ISO 4833). Muscle was obtained aseptically and 25 g placed in a sterile stomacher bag containing 225 ml of buffered peptone water (BPW). Then, 1 ml of sample was introduced into sterile Petri dishes and 10 to 15 ml of previously melted PCA poured into the dish. After mixing and solidification of the mixture, incubation was carried out at 30 °C for 48 to 72 h. Only white colonies that had grown in depth were considered for analysis.

For *Vibrio* spp., the pre-enrichment step was conducted by grinding 25 g of sample in 225 ml of alkaline peptone water with 2% NaCl and then incubated for 24 h at 41 °C. Next, cultures were enriched by culturing on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar plates and incubated at 37 °C for 24 h.

2.4. Chemical analysis

Three independent fish samples per farm were analysed in duplicate. pH was measured in the fish muscle samples by using a meat pH meter (Hanna Instruments). For TVB-N and TMA determinations, the distillation method of a deproteinised sample as recommended by the Committee on European Union (CEE Directive 91/493) was used. To obtain a fish protein-free extract, fish were dissected and 100 g of muscle were homogenised in 200 ml of 7.5% trichloroacetic acid aqueous solution (TCA; Sigma-Aldrich), centrifuged and the supernatants filtered with Whatman® paper (grade 3 quality). Steam distillation was performed with Kjeldahl apparatus (VAPODEST®; Gerhardt). For TVB-N, 25 ml of the filtrated sample, or TCA alone as a blank, were added to the distillation tube and 6 ml of 10% sodium hydroxide added. The steam distillation was recovered into 10 ml of 4% aqueous boric acid solution containing 0.4% of methyl red and bromocresol green (Merck) as an indicator for ammonia titration. The boric acid solution, turned green by alkalinisation produced by the collected TVB-N, was titrated using an aqueous sulfuric acid 0.1 N solution until complete discoloration was achieved. TVB-N values were calculated and expressed as mg N/100 g sample. The applied method is correct if the difference between them is no higher than 2 mg N/100 g.

The TMA method involved an additional step between the deproteinisation of the sample and its distillation by the addition of 20 ml of

Table 1
Description of the sensory characteristics analysed and freshness classification.

Characters observed on fish	Classifications			
	E. Extra	A. Good	B. Acceptable	NA. non-acceptable or rejected
Skin	Bright; iridescent pigment or opalescent; no discolouration	Pigmentation bright but not lustrous	Pigmentation in the process of becoming discoloured and dull	Dull pigmentation
Cutaneous mucus	Aqueous; transparent	Slightly cloudy	Milky	Yellowish grey; opaque
Eye	Convex; black; bright pupil; transparent cornea	Convex and slightly sunken; black dull pupil; slightly opalescent cornea	Flat; opalescent cornea; opaque pupil	Concave in the centre; grey pupil; milky cornea
Gills	Bright colour; no mucus	Less coloured; transparent mucus	Brown/grey becoming discoloured; thick; opaque mucus	Yellowish; milky mucus
Gill covers	Silvery	Silvery, slightly red or brown	Brownish and extensive seepage of blood from vessels	Yellowish
Odour of gills	Seaweed	No smell of seaweed; neutral smell	Fermented; slightly sour	Sour
Consistency of the flesh	Firm and elastic; smooth surface	Less elastic	Slightly soft (flaccid), less elastic; waxy (velvety) and dull surface	Soft (flaccid); scales easily detached from skin, surface rather wrinkled

formaldehyde to the sample filtrate to block the primary and secondary amine groups (Malle and Tao, 1987). TMA values were calculated and expressed as mg TMA/100 g sample.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean ± SD (n = 3). Statistical analysis of the results, including Student's t-test, one- and two-way analysis of variance (ANOVA) and Pearson correlation were performed by SPSS software and the significance fixed at p ≤ 0.05.

3. Results

3.1. Sensory analysis

Fish freshness was determined by odour and appearance of skin, gills, eyes, abdomen, flesh or viscera properties according to CEE directive 2406/96 and shown in Table 1. At the time of rejection, the European sea bass had the following properties: an unpleasant smell, such as pungent, acid, ammonia or putrid; the skin in general was matte, torn, dull, soft (a light finger pressure left marks) with sticky secretions; the scales came off easily; the eyes were dull, glassy, opaque, concave, collapsed into the orbit, lids slightly raised and with red-brown spots; the gills were dry and greyish; the abdomens were flabby, distorted, often inflated and with colourful spots (dark blue, green or black); the viscera were collapsed and inflated; the peritoneum was fragile; and the flesh was friable and light- to dark-red in colour, especially along the spine.

The expert assessment panel made independent and individual sensory analysis of the samples reaching almost the same individual conclusions in all the samples. According to them, the fish that came from the cages and stored in ice conserved B qualification until day 13, while the fish reared in ponds with heated water were only conserved this until day 8 (Table 2). Fish reached NA qualification or rejection at day 15 when reared in cages and earlier, at day 13, when grown in ponds with heated water (Table 2).

3.2. Bacteriological results

TVCs (Fig. 1) and *Vibrio* spp. in European sea bass reared in the two different farming systems and stored in ice were determined. First, *Vibrio* spp. growth results were negative in all the samples. The TVC results showed an increase in bacterial count with increasing storage time. Although the TVC values were always higher in fish reared in ponds with heated water, the differences were not significant with respect to the fish reared in floating cages. The two-way ANOVA showed a significant effect only for the time factor (p = 0.000) and no interaction between farm and time was observed (p = 0.999) (Supplementary Table S1).

3.3. Chemical analysis

The analysed chemical parameters of the sea bass flesh pH (Fig. 2), TVB-N (Fig. 3) and TMA (Fig. 4) increased significantly with storage time, and it was highest in fish from the heated water ponds. For flesh pH, significant differences were observed between fish from the two

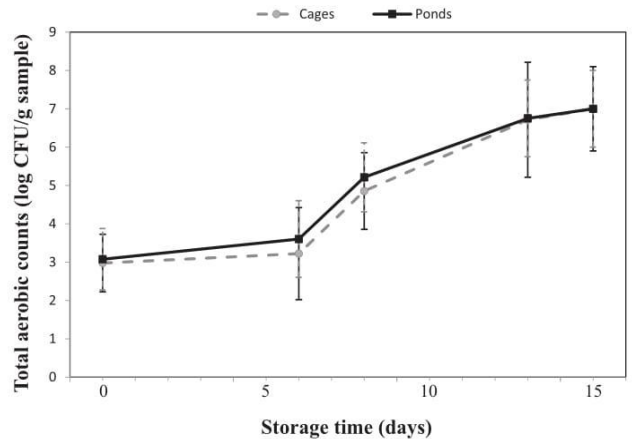


Fig. 1. Microbiological analysis determining total aerobic counts, in log CFU/g, from European sea bass stored in ice and reared in two different farming systems. Data represent the mean ± SD (n = 3).

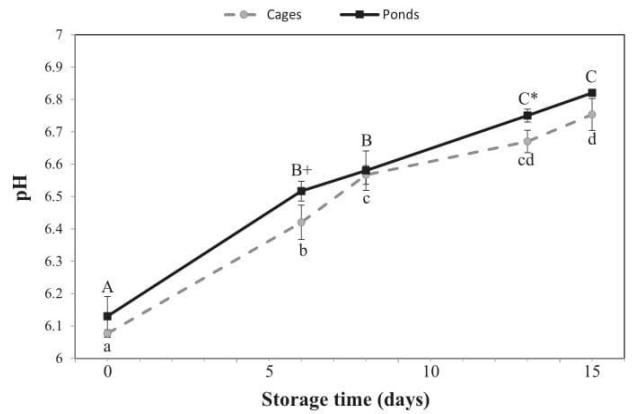


Fig. 2. Evolution of pH in European sea bass stored in ice (0 °C–3 °C) farmed in terrestrial ponds with heated water or marine floating cages. Data represent the mean ± SD (n = 3). Different capital or lowercase letters denote ANOVA significant differences (p ≤ 0.05) in farmed fish sources, respectively, with storage time. Significant differences between the two farming methods at each time are also denoted (t-test; *p ≤ 0.05; +p ≤ 0.1).

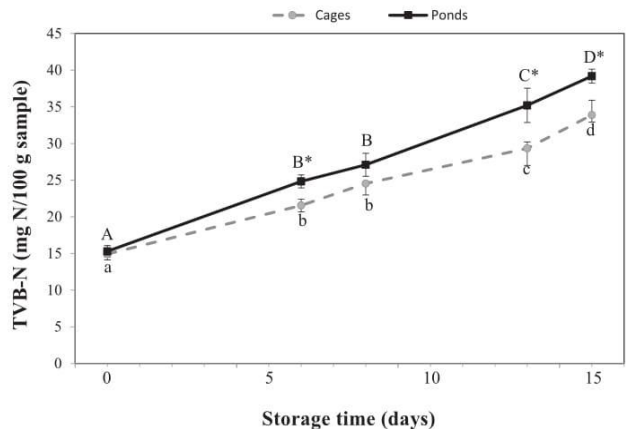


Fig. 3. Evolution of TVB-N in European sea bass stored in ice (0 °C–3 °C) farmed in terrestrial ponds with heated water or marine floating cages. Data represent the mean ± SD (n = 3). Different capital or lowercase letters denote significant ANOVA differences (p ≤ 0.05) in farmed fish sources, respectively, with storage time. Significant differences between the two farming methods at each time are also denoted (t-test; *p ≤ 0.05).

Table 2 Sensory analysis results from the European sea bass stored in ice and reared in two different farm systems. E, extra; A, good; B, acceptable; NA, non-acceptable or rejected.

Farming system	Days on ice				
	0	6	8	13	15
Marine floating cages	E	A	A	B	NA
Terrestrial ponds with heated water	E	A	B	NA	NA

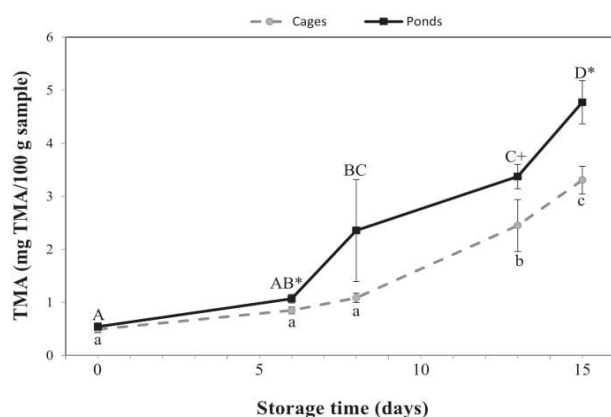


Fig. 4. Evolution of TMA in European sea bass stored in ice (0 °C–3 °C) farmed in terrestrial ponds with heated water or marine floating cages. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$). Different capital or lowercase letters denote significant ANOVA differences ($p \leq 0.05$) in farmed fish sources respectively, with storage time. Significant differences between the two farming methods at each time are also denoted (t -test; * $p \leq 0.05$; + $p \leq 0.1$).

farms after 13 days ($p = 0.037$) and after 6 days ($p = 0.067$) (Fig. 2). However, two-way ANOVA showed that there was no interaction between the farm source and storage time ($p = 0.471$) (Supplementary Table S1). For TVB-N (Fig. 3) and TMA (Fig. 4) levels, when the fish from the two farms were compared, the differences reached significance only after 6, 13 and 15 days of storage in ice. For both chemical parameters, the two-way ANOVA revealed interaction between the two factors ($p = 0.010$ for TVB-N and $p = 0.015$ for TMA) (Supplementary Table S1).

Interestingly, strong and positive correlations of storage time and sensory, microbiological and chemical data were also found (Supplementary Table S2).

4. Discussion

Several methods, including sensory, microbiological and chemical, are available to evaluate the freshness of seafood destined for human consumption. Sensory tests applied to seafood use organoleptic characteristics to evaluate the appearance, texture, smell and taste of a product by defining key characteristics of skin, mucus, eyes, gills and abdomen. This approach, although it leads to subjective results, is of practical importance because it represents the basis on which the inspection officer and informed consumer accepts or rejects fish. The current study's sensory data showed that all sea bass stored in ice were acceptable up to 8 days; after 13 days, the fish from the heated water ponds were deemed spoiled, and after 15 days, the fish from the production cages were deemed spoiled. These data are in clear agreement with previous studies on sea bass stored in ice (Cakli et al., 2006; Kyrana and Lougovois, 2002; Paleologos et al., 2004; Papadopoulos et al., 2003).

One of the most used analytical methods to screen seafood quality is bacteriological cultures, even though they are time-consuming and expensive. Our data showed that TVC was very similar for fish reared in both the farming conditions and increased with storage time in ice. The data revealed very low initial bacterial counts (around 3 log CFU/g) that were maintained for up to 6 days, indicating very good initial fish quality; the accepted initial maximum count is 5 log CFU/g (ICMSF, 1986). The current study's data at the beginning (3 log CFU/g) are roughly similar (Cakli et al., 2006; Kostaki et al., 2009) or lower (Papadopoulos et al., 2003) than those previously reported for whole or sliced sea bass. Alternatively, the accepted bacterial count for fish rejection is set at 7 log CFU/g (ICMSF, 1986), which is usually reached in

sea bass stored in ice after 8 days or more (Kostaki et al., 2009; Kyrana and Lougovois, 2002; Papadopoulos et al., 2003; Parlapani et al., 2015) depending on the study. However, sea bass from ponds with heated water were rejected after 13 days when the TVC was slightly lower than 7 log CFU, although, both sensory analysis and TVC showed positive correlations. Additionally, many studies have also determined counts for lactic acid bacteria, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* or *H₂S*-producing bacteria (Kostaki et al., 2009; Papadopoulos et al., 2003; Parlapani et al., 2014, 2015) to find the most relevant to fish spoilage. However, while the limit of 7 log CFU is widely accepted for rejection, the accepted limits for these specific bacteria are not so clear. Likely, though TVC in sea bass from the two farming systems are very similar the particular bacterial populations should be different and might account for the differences found in the chemicals analysed, a fact that is worthy to be investigated in depth.

Bacterial populations living on seafood and their by-products are the main factors responsible for chemical changes in seafood leading to spoilage; TVC and chemical parameters show positive and strong correlation. One of the important and simplest chemical parameters for the determination of fish quality during storage periods is pH. pH in live fish muscle is close to 7, however post mortem pH varies from 5.5 to 7.1 depending on the season, species and other factors (Haard, 2002; Simeonidou et al., 1997). A low pH is used as an indicator of stress at the time of fish sacrifice since the stress produced increases lactate levels and therefore generates acidic pH, which in turn decreases myofibril organisation and increases the oxidation of myoglobin and lipids (Haard, 2002). Interestingly, the pH of the sea bass when it reached non-acceptance was 6.75; that is, after 13 days for the fish from heated water ponds and after 15 days for the fish from the marine cages. However, some small variations in the timing of the occurrence of this pH have been recorded (Kyrana and Lougovois, 2002). Strikingly, other studies recorded pH very close to the current study's (Kostaki et al., 2009; Kyrana and Lougovois, 2002), and another study reported pH varying between 7.33 and 7.5 (Papadopoulos et al., 2003) throughout storage in ice. In contrast, the current study showed a strong positive relationship between pH, TVB-N, TMA and total bacterial count, also found by others (Kyrana and Lougovois, 2002). This suggests that bacterial growth is responsible for the generation of alkaline by-products that increases pH.

In fish degradation processes, because of the low levels of carbohydrates and the complexity and variability of lipid, glycolysis and lipolysis, respectively, they have low impact, and proteolysis is the most important contributing factor. However, apart from enzymatic degradation of proteins, the action of bacterial enzymes leading to release of peptides and amino acids seems to be more relevant. Many bacteria can degrade fish proteins and produce ammonia and a large number of volatile amines, which are responsible for spoilage odour (Malle and Poumeyrol, 1989). In addition, bacteria are able to transform fish TMAO oxidise to TMA, which also contributes to a fishy odour. Thus, determination of TVB-N and TMA are amongst the preferred chemicals to ascertain seafood freshness. The current study's data showed initially low levels of TVB-N and TMA in fresh sea bass that increased with storage time; always higher in sea bass reared in ponds with heated water. In the current study, spoilage of the sea bass was observed at TVB-N and TMA values higher than 33 and 3.7 mg/100 g sample, respectively. With regard to TVB-N established limits, values of 35 (CEE decision 95/149/EC) or 25 (Masniyom et al., 2002) mg N/100 g have been proposed as the onset of spoilage for whole and sliced sea bass, respectively. Thus, the current study's TVB-N data agrees with the CEE limits and most reports for sea bass (Cakli et al., 2006; Kyrana and Lougovois, 2002; Papadopoulos et al., 2003; Parlapani et al., 2015). With regard to TMA, production of which is mainly associated with the presence of *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* and *Sewanella putrefaciens* bacteria, its levels were very low as also documented in other studies (Cakli et al., 2006; Kostaki et al., 2009; Kyrana and Lougovois, 2002; Papadopoulos et al., 2003; Parlapani et al., 2015). This is related

to low TMA oxide content in fish and/or a low level of H₂-producing bacteria, mainly *S. putrefaciens*, which was not determined herein. This TMA production is, at least in this study, not produced by *Vibrio* spp. because they were not detected in the current study. There exists some controversy about the TMA limits. Thus, fish rejection levels were proposed at 10–15 mg TMA/100 g (Huss, 1995), and established at 4 (Kostaki et al., 2009), 5 (Masniyom et al., 2002; Özden et al., 2007) and 8 (Kilinc et al., 2007) mg TMA/100 g for sea bass. Comparatively, the lower TMA limit observed in the current study, around 3.3 mg TMA/100 g, could be attributable to lower bacterial counts, and likely to low numbers of H₂-producing bacteria, which should be ascertained. However, though some authors (Cakli et al., 2006; Papadopoulos et al., 2003) have failed to propose TMA as a good marker for fish quality after ice storage, the current study's data contradict them.

In conclusion, the current study demonstrated that European sea bass reared in ponds with heated water show significantly greater pH, TVB-N and TMA when stored in ice compared to those reared in open sea floating cages coinciding with earlier rejection by sensorial analysis. This study demonstrates that not only the storage method affects the freshness and quality of fish products but also the fish farming conditions. Further studies are needed to understand the reasons behind the differences related to the farming system and management, a variable that has not been previously considered in fish.

Acknowledgements

Financial support by grant 19883/GERM/15 (*Fundación Séneca de la Región de Murcia*, Spain) and the officials of the Central Laboratory of the Stewardship of the National Army in Algeria (Laboratoire Central de l'Intendance de l'Armée Nationale Populaire) are gratefully acknowledged. DM thanks to the *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique* (Algeria) the fellowship (reference 113/PNE/ENS./Espagne/2015-2016).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.032>.

References

- Bernardi, D.C., Mársico, E.T., Freitas, M.Q., 2013. Quality Index Method (QIM) to assess the freshness and shelf life of fish. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 587–598. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000400009>.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., Tolasa, S., 2006. Effects of gutting and un-gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 519–527. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390500343209>.
- Castro, P., Padron, J.C.P., Cansino, M.J.C., Velazquez, E.S., De Larriva, R.M., 2006. Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* 17, 245–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.015>.
- Dalgaard, P., 2015. Spoilage of seafood. In: Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, London, pp. 2462–2472.
- Duan, J., Cherian, G., Zhao, Y., 2010. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) filets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chem.* 119, 524–532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.055>.
- FAO, 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and Challenges*. Rome, ITALY.
- Feidi, I.H., 1998. Fisheries development in the Arab world. In: *Yale Forestry and Environmental Studies Bulletin Series*, pp. 388–406.
- Haard, N., 2002. The role of enzymes in determining seafood color, flavour and texture. In: *Safety and Quality Issues in Fish Processing*. Elsevier, pp. 220–253. <http://dx.doi.org/10.1533/9781855736788.2.220>.
- Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* 348.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: *CMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*. University of Toronto Press, Toronto, pp. 181–196.
- Kilinc, B., Cakli, S., Cadun, A., Dincer, T., Tolasa, S., 2007. Comparison of effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4 °C. *Food Chem.* 104, 1611–1617. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.002>.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaids, I.N., Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) filets. *Food Microbiol.* 26, 475–482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.008>.
- Kyran, V.R., Lougovois, V.P., 2002. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 319–328. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00572.x>.
- Malle, P., Poumeyrol, M., 1989. A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *J. Food Prot.* 52, 419–423. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.419>.
- Malle, P., Tao, S.H., 1987. Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *J. Food Prot.* 50, 756–760. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-50.9.756>.
- Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2002. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *J. Sci. Food Agric.* 82, 873–880. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1108>.
- Mazandrani, H.A., Javadian, S., Bahram, S., 2016. The effect of encapsulated fennel extracts on the quality of silver carp filets during refrigerated storage. *Food Sci. Nutr.* 4, 298–304. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.290>.
- Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques, 2014. *Secteur de la pêche et de l'aquaculture BILAN (2012–2014), Prospective 2030 et projet «PLAN AQUAPECHE 2020»*. Alger.
- Oehlenschläger, J., 2014. Seafood quality assessment. In: Boziaris, I.S. (Ed.), *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, pp. 361–386.
- Özden, Ö., İnugür, M., Erkan, N., 2007. Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Radiat. Phys. Chem.* 76, 1169–1178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.11.010>.
- Paleologos, E.K., Savvaids, I.N., Kontominas, M.G., 2004. Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiol.* 21, 549–557. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.009>.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaids, I., Kontominas, M., 2003. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiol.* 20, 411–420. [http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00148-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00148-X).
- Parlapani, F.F., Mallouchos, A., Haroutounian, S.A., Boziaris, I.S., 2014. Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream filets under various conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 153–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2014.08.006>.
- Parlapani, F.F., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E., Boziaris, I.S., 2015. Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. *Food Microbiol.* 50, 44–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.006>.
- Simeonidou, S., Govaris, A., Varelziz, K., 1997. Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Res. Int.* 30, 479–484. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00008-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00008-8).

REFERENCES

1. FAO., L'État de l'insécurité alimentaire dans le monde 2001. Rome, (2001). 58 pages (également consultable en ligne à l'adresse www.fao.org/docrep/003/y1500f/y1500f00.htm)
2. FAO, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous. Rome2016), (2016). 224 pages.
3. Guichard, B. Enquête "Pathologie des poissons 2004" : résultats & analyse. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, (2004), Brest, France.
4. Feidi IH., Fisheries development in the arab world. In: Yale Forestry and Environmental Studies Bulletin Series. (1998), pp 388–406
5. FAO The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges. (2014) Rome. ITALY
6. Nicolas, Orioux., Quantification et prévalence de *Flavobacterium psychrophilum* chez les truites arc-en-ciel d'aquaculture ; relation hôte-pathogène et réponse immunitaire. Thèse de doctorat : géochimie et écotoxicologie : Ecole Doctorale Sciences et Environnement. Université Bordeaux, (2011),1, 118p.
7. FAOb Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (page consultée le 01/09/2017) (2017) [en ligne]. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_algeria/fr
8. Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques 2014. Secteur de la Pêche et de l'Aquaculture. Bilan (2012-2014). Prospective 2030 et Projet « Plan Aqua Pêche 2020 ».
9. FAOa Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (page consultée le 04/10/2017). *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (2017), [en ligne]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/fr
10. Fritsch. M., Traits biologiques et exploitation du Bar commun *Dicentrarchus labrax* dans les pêcheries françaises de la Manche et du golfe de Gascogne. Thèse de doctorat : Faculté des sciences. Brest : Université de Bretagne occidentale, (2005), 297p.
11. Blancheton IP., Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*, , 22, (2000) : 17-31.
12. Deslous, P., Jean-Marc, D.,A., Peruzzi, S., Plisciculture- Environnement:Les bases de physique et de biologie marine en soutien à la législation des ICPE en Méditerranée. IFREMER, (2002), 57p.

13. Bernardet J.F., Michel C., Duchaud, É., Mansour A., Bactériose des poissons d'aquaculture. In Bull. Acad. Vét. France (2007). Tome 160 - N°, 53-56
14. Noga, E.J.. Fish disease, diagnosis and treatment. Mosby, St Louis, Missouri (1996).
15. Austin, B. & Austin, D.A. Bacterial fish pathogens : disease of farmed and wild fish. 3rd edition. Springer et Praxis Publishing Ltd., (1999), Chichester, UK.
16. Woo, P.T.K. & Bruno, D.W. Fish diseases and disorders ; volume 3: viral, bacterial and fungal infections. (1999), CABI Publishing, Oxon, UK.
17. Graziella Bourdin, La contamination microbienne des produits de la pêche. Académie d'Agriculture de France (2010).
18. Håstein, T., Surveillance et prophylaxie des maladies des poissons marins. Département des maladies des poissons, Laboratoire vétérinaire central, Oslo, Norvège. OIE Scientific and Technical Review (1996),15, 251-266.
19. B. Austin, D.A. Austin, Vibrionaceae representatives, in: Bact. Fish Pathog., Springer Netherlands, Dordrecht, (2012), pp. 357–411.
20. C. Baker-Austin, J.A. Trinanes, N.G.H. Taylor, R. Hartnell, A. Siitonen, J. Martinez-Urtaza, Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming, Nat. Clim. Chang. 3, (2012) 73–77.
21. L.A. Actis, M.E. Tolmasky, J.H. Crosa, Vibriosis., in: Fish Dis. Disord. Vol. 3 Viral, Bact. Fungal Infect., CABI, Wallingford, (2011), pp. 570–605.
22. Subramanian S, MacKinnon SL, Ross NWA comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative. Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biol ; 148, (2007) 256-63.
23. Jean-Pierre, L., et Pierre B., système immunitaire des poissons téléostéens. In : Médecine/Sciences N° 4; Vol 25, (2009), 405411
24. Imbeault, S., Utilisation des bactériophages pour la prévention d'infections bactériennes en aquaculture. Thèse de doctorat : Science de l'eau. Québec : Université du québec INRS-ETE (2004), 116p.
25. Bourmaud, C.,. Production de sondes monoclonales anti immunoglobulines de loup {Dicentrarchus labrax Linné, 1758} : intérêt en immunologie fondamentale et appliquée. Thèse de doctorat : Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. (1994). pp. 255.

26. Breuil, G., Le système immunitaire du bar, *Dicentrarchus Labrax*. immunoglobulins, cellules productrices d'immunoglobulines, ontogenèse, applications à une pathologie virale néonatale. Thèse de doctorat : Biologie des organismes. Université Montpellier II, (1997) 218p.
27. Angelidis, P., Elément du système immunitaire du Bar (*Dicentrarchus labrax*) et de la truite (*Salmo gairdneri*). Thèse de doctorat : océanologie biologie. Université de Bretagne occidentale., (1987).171p.
28. Shewan, J.M., The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In: J. Hawthorn et J. Muil Leitch (eds.), *Recent advances in food science*, 1, (1962), 167-193.
29. Shewan, J.M. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: *Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish.*, Tropical Products Institute, London, (1977). 51-6
30. Huss, H.H., Fresh fish-quality and Quality Changes. *FAO Fisheries Technological papers*. N° 29. Rome, FAO, (1988), 15-16, 23, 57.
31. Huss, H., Assurance of Seafood Quality. *FAO Fisheries Technical Paper No. 334*. FAO. (1994). Rome.
32. Shewan J.M et Murray C.K., The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrophiles. In.: *Cold-tolerant microbes in spoilage and the environment*, p117, éd. A.D. Russell R. Fuller. (1979). Londress, Academic press.
33. Murray C.K. et Fletcher T.C., The immunogisto-chemical localization of lysozyme in plaice (*pleuronectes platessa*) tissues. *Journal of fish Biology*, 9, (1976), 329-334.
34. Andries, S., La qualité du poisson frais : Méthodes d'évaluation et utilisation de la méthode HACCP au stade d'une criée. Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire : Faculté de médecine de Nantes. (2002), 127 p.
35. Djamal, M., Correlation entre l'analyse organoleptique et chimique (teneur en azote basique volatile total et triméthylamine) utilisées pour l'appréciation de la fraîcheur de la sardine. Mémoire pour le diplôme de magister en science vétérinaire: Ecole nationale vétérinaire d'Elharrach, Alger (2009), 113 p.
36. Kjosbakken, J., et Larsen, H., Bakteriell dekomponering av fisk I bulk. 1. Isolasjon av anaerobe ammoniak-producerende bakterier, *Inst. Technical Biochemistry, NTH, Univ. of Trondheim, Nornége*. (1974), P.37.

37. Jensen, M.H Storage of chilled cod under vacuum and at various concentrations of carbon dioxide. In: *Advances in fish science and technology*, éd. J.J. Connel. Fanham, Surrey, Royaume-Uni, Fishing News (Books) Ltd. (1980), P294-297.
38. Huss, H.H., Storage life prepacked wet fish at 0°C. 1. Plaice and haddock. *Journal of Food Technology*, 7, (1972). 13-19.
39. Gram L., Leisner J.J., Spoilage of fish. In: *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press, (1999), 813-821.
40. Klausen, N.K. et. Huss,H.H., Growth and histamine production by *Morganella morganii* undr various temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 5, (1987), 147-156.
41. Ababouch, L., Afilal, M.E., Benabdeljelil, H. et Busta, F.F. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines (*sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. *International Journal of Food Science and Technology*. 26, (1991), 297-306
42. Taylor, S.L., Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *CRC Critical reviews in toxicology*, 17, (1986), 91-128.
43. Slatter J. et Lorentz, W., Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis : studies of three prognostic variables in an epidemiological model. *Journal of Neural Transmission supplementum* 32,(1990), 291-314.
44. Sainclivier, M., L'industrie alimentaire halieutique. Première partie : Le poisson matière première, Rennes : ENSA, (1983). 263 p.
45. ITSV, Les produits de la pêche, Paris: ITSV, (2001). 15 p.
46. Communauté européenne. Règlement (CEE n° 2406/96) du conseil du 26 novembre 1996 fixant des normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, (L. 334 du 23 Décembre 1996) : 1-15.
47. Hyldig, G. et Nielsen, J.A., Rapid sensory method for quality management. In : *Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final Meeting of the concerted Action "Evaluation of fish freshness"* AIR3CT94 2283. Nantes (FR) (1997), 297-305.
48. Malle, P., Poumeyrol, M. A new chemical for the quality control of fish: Trimethylamine/Total Volatil Basic Nitrogen (%). *Journal of Food Protection*. 52, (1989), 419-423.

49. Malle, P. Vanelle, A.M. et Petit, A. Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins. Eléments pour une normalisation de la détermination, de l'expression et de l'exploitation de l'ABVT. Recueil de Médecine Vétérinaire. 165, (1989), 395-402
50. Oehlenschager, J. et Nesvadba, P.. Methods for freshness measurement based on electrical properties of fish tissue. In : Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final Meeting of the Concerted Action « Evaluation of fish freshness » AIR3CT94 2283. Nantes (FR), Paris : Institut International du Froid. (1997), 363-368.
51. CVPM (Centre technique spécialisé des produits de la pêche) Aide-mémoire pour l'interprétation des résultats d'analyses des produits de la pêche et d'aquaculture. Fiche technique n° 13. Boulogne- sur- mer. (2006), 10 p.
52. Leduc, F., Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Thèse de doctorat : Biochimie. Université Sciences et Technologies de Lille. (2011),1, 182p.
53. Communauté européenne (1991). Directive du conseil du 22 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche (91/493/CEE). Journal Officiel Des Communautés Européennes,(L. 268 du 24 Septembre 1991) : 15-34
54. Duflos, G., Dervin, C., Malle, P. et Bouquelet, S., Use of biogenic Amines to evaluate Spoilage in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). Journal of AOAC International. (1999), 82, 1357-1363
55. Taylor, S.L. Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. CRC Critical reviews in toxicology, 17, (1986), 91-128
56. Etienne, M., L'ABVT, L'Histamine. Nantes : Laboratoire qualité et physico-chimie IFREMER, (1998) 2 p.
57. Ehira, N et Uchiyama, H., Determination of fish freshness using K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In: Seafood Quality Determination. Kramer D.E. and Liston J.C., eds, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam. (1986), 185-207
58. Henehan, G., Adenine nucleotides and their metabolites as determinants of fish freshness. In: Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final Meeting of the Concerted Action « Evaluation of fish freshness » AIR3CT94 2283. Paris : Institut International du Froid. (1997). 266-270.

59. Olafsdottir, G. et Fleurence, J., Evaluation of fish freshness using volatile compounds-Classification of volatile compounds in fish. In: Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final Meeting of the Concerted Action « Evaluation of fish freshness » AIR3CT94 2283. Nantes (FR), Paris : Institut International du Froid. (1997), 55-69
60. Toranzo A.E., Magariños B., Romalde J.L., A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture*. 246, (2005) 37–61.
61. Eaton F.A.H. A., Clesceri L., Greenberg A., Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 1995.
62. VetScan Avian Reptilian Profile Plus For Veterinary use only Customer and Technical Service 1-800-822-2947. PN : 500-7131, Rev : D. (2007), 57p
63. Quade, M.J., Roth J.A., rapid, A., direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58 (1997) 239–248.
64. Ross, N.W. . Firth, K., Wang, J.A., Burka, J.F., Johnson, S.C., Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation., *Dis. Aquat. Organ.* 41 (2000) 43–51.
65. Hanif, A., Bakopoulos, V., Dimitriadis, G. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae, *Fish Shellfish Immunol.* (2004). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464804000452> (accessed October 18, 2016).
66. Tort, J.O. L., Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway,
67. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, (1995), 333–345.
68. Livak, K.J., Schmittgen T.D.,. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods*. 25, (2001), 402–408.
69. Cerezuela, R., Meseguer, J., Esteban, M.Á., Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 34, (2013), 843–848.

70. Balebona, M.C., Andreu M.J., Moriñigo, M.A. Zorrilla, I., M.A., Borrego, J.J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.), *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4269–75. J.L. Romalde, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen, *Int. Microbiol.* 5, (2002), 3–9.
71. Damir K., Irena,V., Damir,.S. Emin, V. T., Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea, *Mar. Pollut. Bull.* 75, (2013), 46–52..
72. Sadok, K. Mejdj,S. Nourhen, S. Amina B., Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated during Tunisian fish farm outbreaks, *Folia Microbiol. (Praha).* 58, (2013), 17–26.
73. Austin, B. . Austin, D.A., *Aeromonadaceae* representatives (Motile Aeromonads), in: *Bact. Fish Pathog.*, Springer Netherlands, Dordrecht, (2012), pp. 119–146.
74. Doukas, A., Karagouni, D., Short communication *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea, *J. Fish Dis.* 21, (1998), 317–320.
75. Candan A., Küçüker, M., Motile aeromonad septicaemia in *Salmo salar* cultured in Black Sea in Turkey, *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15, (1995), 195–196.
76. Drzewiecka, D. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments, *Microb. Ecol.* 72, (2016), 741–758.
77. Mandal, Mandal, S. Pal,N.K. Halder, P.K. Basu,P.S., R-factor in *Proteus vulgaris* from ulcerative disease of fish, *Channa punctatus.*, *Indian J. Exp. Biol.* 40, (2002), 614–6.
78. Hickman, F.W. Farmer,J.J. . Hollis, D.G Fanning, Steigerwalt G.R. Weaver,A.G., Brenner, Brenner D.J., Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea., *J. Clin. Microbiol.* 15, (1982), 395–401.
79. Zou,R. Ji, Hu, W. S. Yan, Q., Vaccination in three different ways against vibriosis of *Seriola dumerili* caused by *Vibrio hollisae*, *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 26, (2008) , 233–237.
80. Al-Sunaiher, A.E., Ibrahim, A.S.S. Al-Salamah, A.A. Association of *Vibrio* species with disease incidence in some cultured fishes in the kingdom of Saudi Arabia, *World Appl. Sci. J.* 8, (2010), 653–660.

81. Machado, M. Azeredo, R. Díaz-Rosales, P. Alfonso, A. Peres, H. Oliva-Teles, A. Costas, B. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response, *Fish Shellfish Immunol.* 42, (2015), 353–362.
82. Henry, M.A. Alexis, M.N. Fountoulaki, E. Nengas, I. Rigos, G. Effects of a natural parasitological infection (*Lernanthropus kroyeri*) on the immune system of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L, *Parasite Immunol.* 31, (2009), 729–740.
83. Valero, Y. A., Esteban, M.Á., Cuesta, A. E., Antimicrobial response is increased in the testis of European sea bass, Chaves-Pozo, but not in gilthead seabream, upon nodavirus infection., *Fish Shellfish Immunol.* 44, (2015), 203–13.
84. Meloni, M. Candusso, S. Galeotti, M. Volpatti, D., Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following in vivo infection with *Vibrio anguillarum*. A time course experiment, *Fish Shellfish Immunol.* 43, (2015), 82–90.
85. M.P.R.H. (2014), Secteur de la pêche et de l'aquaculture BILAN (2012-2014), Prospective 2030 et projet « PLAN AQUAPECHE 2020 », Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques, Route des quatre canons, Alger, 72p.
86. Aqu@nova sp. Potentiel et perspectives de la technologie du circuit recyclé au Québec : emphase sur l'utilisation en mariculture. Publication SODIM. (2003), 30 p. www.sodim.org/pdf/AutresEspecies/710,17_Recircul.pdf
87. Duan, J., Cherian, G., Zhao, Y., Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chem.* 119, (2010), 524–532.
88. Mazandrani, H.A., Javadian, S., Bahram, S., The effect of encapsulated fennel extracts on the quality of silver carp fillets during refrigerated storage. *Food Sci. Nutr.* 4, (2016), 298–304.
89. Oehlenschläger, J., Seafood quality assessment. In: Boziaris, I.S. (Ed.), *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK. (2014), pp. 361–386.
90. Dalgaard, P., Spoilage of seafood. In: Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, London. (2015), pp. 2462–2472.
91. Parlapani, F.F., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E., Boziaris, I.S., Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. *Food Microbiol.* 50, (2015), 44–53.

92. Kyra, V.R., Lougovois, V.P., Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, (2002), 319–328.
93. Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I., Kontominas, M., Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiol.* 20. (2003), 411–420.
94. Paleologos, E.K., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiol.* 21. (2004), 549–557.
95. Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., Tolasa, S., Effects of gutting and uncutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, (2006), 519–527.
96. Communauté européenne. Directive du conseil du 22 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche (91/493/CEE). *Journal Officiel Des Communautés Européennes*, (L. 268 du 24 Septembre 1991) : 15-34.
97. Malle, P. et TAO, S. H. Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50, (1987), 756-760.
98. Haard, N. The role of enzyme in determining seafood color, flavor and texture. In: *Safety and quality issues in fish processing*. H.A. Bremner. Cambridge, UK, Woodhead Publishing in Food Science and Technology: (2002), 221-254
99. Simeonido, S., Govaris, A., and Varelziz, K., Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*). *Zeitschrift für Lebensmittel undforschung A204* (6), (1997), 405 – 410.
100. Morzel, M., and Van De Vis, H., Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla*), *Blackwell Science Ltd* 34 (2003), 1-11.
101. Hebard, C.E., Flick, G.J., and Martin, R.E., Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products* . (1982).149-304.
102. Park, Y. H., Kim, D.S., Kim, S.S. et Kim S. B.. Changes in histamine content in the muscle of dark-fleshed during storage and processing. Changes in histamine in common mackerel, shad and sardine. *Bull. Kor. Soc.*, 13, (1980), 15-22.

103. Zhang, Y., Lu, H. et Levin, R.E., Enhanced storage- life of fresh haddock fillets with stabilised sodium chlorite in ice. *Food Microbiology*, 20, (2003). 87-90.
104. Kostaki, M., Gitrakou, V., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiol.* 26, (2009), 475–482.
105. Chinivasagam, H.N., Bremer, H.A., Wood, A.F., and Nottingham, S.M., Volatile Components Associated with Bacterial Spoilage of Tropical Prawns. *International Journal of Food Microbiology* 42, (1998), 45-55.
106. Kilinc, B., Cakli, S., Cadun, A., Dincer, T and Tolasa, S.,. Comparison of effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Food chemistry* 104, (2007), 1611-1617.
107. Rodriguez, O., Losada, V., Auborg, S. P., and Barros-Velazquez, J.. Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, 37. (2004), 749–757.
108. Rodriguez, O., Barros-Velazquez, J., Ojea, A., Pineiro, C., Gallardo, J. M., and Auborg, S.,. Effect of chilled storage in flow ice on the microbiological quality and shelflife of farmed turbot (*Psetta maxima*). Isolation and identification of major proteolytic bacteria. In *Proceedings of the first joint trans-Atlantic fisheries technology conference. TAFT 2003, 33rd WEFTA and 48th AFTC meetings (2003) (pp.73–74). Reykjavik, Iceland.*
109. Pineiro, C., Vazquez, J., Perez-Diz, A., Gallardo, J. M., and Auborg, S.,. (2003). Chemical changes related to quality loss during farmed turbot chilling by applying flow and traditional icing. In *Proceedings of the first joint trans-Atlantic fisheries technology conference. TAFT 2003. 33rd WEFTA and 48th AFTC meetings (pp. 71–72). Reykjavik, Iceland.*
110. Dalgaard, P.. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26. (1995), 319–33.
111. Drosinos, E. H., and Nychas, G.-J. E. *Brochothrix thermosphacta*, a dominant organism in during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*, 19, (1996), 617–625.
112. Koutsoumanis, K., and Nychas, G.-J. E.,. Application of a systematic procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 60, (2000), 171–184.

113. Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Oksuz, A., Garhtwaite, T., Alexis, M. N., and Grigorakis, K.. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, 72, (2001), 33–40.
114. Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., & Tolasa, S. Effects of using slurry ice on the microbiological, chemical and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4 °C. *European Food Research and Technology*, 222. (2006c), 130–138.
115. Communauté européenne (2005). Règlement (CEE n° 2074/2005) du conseil du 5 Décembre 2005 fixant les valeurs limites en Azote Basique Volatil Total (ABVT) pour certaines catégories de produits de la pêche et méthodes d'analyse à utiliser. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, (L. 338 du 22 Décembre 2005) : 10-13.
116. Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *J. Sci. Food Agric.* 82, (2002), 873–880.
117. Huss, H.H.,. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* 348. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*. University of Toronto Press, Toronto, (1995), pp. 181–196.
118. Özden, Ö., İnuğur, M., Erkan, N.,. Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Radiat. Phys. Chem.* 76, (2007), 1169–1178.