

Université
de Liège



Université d'Oran1, ALGERIE
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie



Université de Liège, BELGIQUE
Faculté de Médecine Vétérinaire
Département des Sciences des Denrées Alimentaires

THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

Présentée et soutenue le **23 avril 2015** à Oran, Algérie

Par
DERGAL Nadir Boudjlal

En vue de l'obtention du grade de **DOCTEUR** de :

L'Université d'Oran 1. Spécialité : **Aquaculture et Contrôle de Qualité**
L'Université de Liège. Spécialité : **Sciences Vétérinaires**

Evaluation des systèmes de management de la sécurité et de la qualité de l'aquaculture du tilapia du Nil "*Oreochromis niloticus*" dans l'Ouest algérien

Composition du Jury :

Pr. BOUTIBA Z.	Université d'Oran 1, Algérie	Président du Jury
Pr. GILLET L.	Université de Liège, Belgique	Président du collège doctoral de l'ULg
Pr. AIT YAHIA D.	Université d'Oran 1, Algérie	Examinatrice
Pr. DELCENSERIE V.	Université de Liège, Belgique	Examinatrice
Pr. AUBOURG-MARTINEZ S.P.	Institut de Recherches Marines de Vigo (CSIC), Espagne	Examineur
Pr. KESTEMONT P.	Université de Namur, Belgique	Examineur
Pr. MELARD C.	Université de Liège, Belgique	Examineur
Pr. ABI-AYAD S-M.E-A.	Université d'Oran 1, Algérie	Directeur de thèse
Pr. SCIPPO M-L.	Université de Liège, Belgique	Directrice de thèse

Année universitaire: 2014-2015

Le Professeur M.L. SCIPPO et le Professeur S-M.E-A ABI-AYAD copromoteurs de cette thèse de Doctorat en cotutelle entre l'Université de Liège et l'Université d'Oran 1 ont accepté la publication de cet ouvrage. L'auteur et les promoteurs autorisent sa consultation et sa photocopie pour usage personnel.

Toute utilisation doit se conformer aux dispositions sur les droits d'auteurs, en particulier l'obligation de mentionner la source lors d'utilisation de résultats de cette étude.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2015/0480/7

ISBN 978-2-87543-060-1

ISBN 978-2-87543-060-1



9 782875 430601

RESUME

Cette thèse a été entreprise afin d'élaborer et de développer le premier modèle HACCP spécifique pour la gestion de la qualité *ante et post mortem* du tilapia (*Oreochromis niloticus*) produit au niveau de la ferme continentale "Fat-Steppes" (Ouest algérien). Pour ce faire, différents points critiques (PCC) ont été déterminés et maîtrisés tout au long de la phase d'élevage et de commercialisation.

Durant la phase d'élevage, les résidus d'antibiotiques, les résidus de la 17 α -méthyle testostérone et la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau et de l'aliment d'élevage ont été évalués. Une stratégie analytique pertinente a été développée basée sur une première technique microbiologique de screening qui a été améliorée et partiellement validée pour l'identification des tétracyclines et des fluoroquinolones. Suivie d'une seconde technique LC-UV-MS qui a été spécialement optimisée pour l'identification et la quantification de l'acide oxolinique. Une nouvelle méthode d'extraction, compatible avec un test immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), a été optimisée pour la détection des résidus de 17 α -méthyle testostérone (MT) dans la chair du poisson, dans l'eau et l'aliment d'élevage.

Le profil nutritionnel du tilapia produit à Fat Steppes a été caractérisé en déterminant sa composition en macronutriments, son profil en acides gras et en acide aminés.

Par la suite, l'évolution temporelle de la qualité hygiénique, du tilapia conservé à 4°C et 30°C, a été évaluée par une approche sensorielle, microbiologique (Flore Mésophile Aérobie Totale et Entérobactéries) et biochimique. L'analyse des diènes conjuguées, des hydroperoxydes et des TBARS "Thiobarbituric acid reactive substances" a servi pour évaluer l'oxydation lipidique. L'analyse d'azote basique volatil total "ABVT", la triméthylamine "TMA" et les amines biogènes a servi pour évaluer la protéolyse bactérienne et enzymatique.

Les résultats obtenus ont démontrés des performances satisfaisantes des deux techniques d'analyse des résidus d'antibiotiques. La capacité de détection (CC β) du test de screening est de 0,75 fois la limite maximale de résidus (LMR) de l'acide oxolinique (OXO) et la limite de la quantification chromatographique LC/UV est de LMR/20. Le délai d'attente de l'OXO est estimé à 8 jours après un traitement de six jours successifs avec une dose de 12 mg/ kg de poids vif. La nouvelle méthode d'extraction des résidus d'MT est acceptable en termes de rendement d'extraction (55 % pour la chair et 85 % pour l'eau) et de linéarité ($R^2 = 0,998$). Le délai d'attente des résidus de la MT est estimé à deux mois après un traitement avec une dose ≤ 65 mg MT/kg d'aliment, pendant 28 jours, à partir du 10^{ème} jour post-éclosion. Des seuils microbiologiques de 10³ ufc/100 ml de coliformes fécaux et de 3 x 10⁶ ufc/g de flore mésophile aérobie totale (FMAT) sont retenus comme critères de bonne

RESUME

qualité microbiologique de l'eau et de l'aliment d'élevage respectivement. Le tilapia algérien est considéré comme un poisson maigre ($\pm 0,33$ % de lipide) et riche en protéines ($\pm 17,3$ %). Son profil en acides aminés essentiels et en acides gras polyinsaturés est relativement intéressant. Les paramètres de performance de la nouvelle méthode HPTLC "High Performance Thin Layer Chromatography", développée pour le screening et la quantification de six amines biogènes d'intérêt, sont satisfaisants en termes de linéarité ($R^2 > 0,98$), de justesse (> 84 %), de fidélité. La limite de détection (LOD) de la méthode HPTLC est de l'ordre de $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de chair de poisson. Les résultats de l'analyse organoleptique, microbiologique et biochimique sont fortement et positivement corrélés et révèlent que la date d'utilisation optimale du tilapia est limitée à 12 heures et à 5 jours de conservation à 30°C et à 4°C respectivement. Après ces délais, le poisson est rejeté par l'appréciation organoleptique et tous les seuils critiques établis dans ce travail sont dépassés. Des valeurs de l'ordre de : $6 \log \text{cfu g}^{-1}$ pour les FMAT et les entérobactéries, $0,85 \text{ mg MDA kg}^{-1}$ de poids humide, $35 \text{ mg ABVT-N } 100 \text{ g}^{-1}$ de chair, $8 \text{ mg TMA-N } 100 \text{ g}^{-1}$ de chair, $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de putrescine et de cadavérine sont retenus comme critères microbiologiques et biochimiques respectivement.

Mots clés : *Oreochromis niloticus*, HACCP, acide oxolinique, 17α -méthyle testostérone, amines biogènes, HPTLC, screening microbiologique, TBARS, TMA, hydroperoxydes, analyse sensorielle, ABVT, diènes conjugués, HPLC/UV/MS.

ABSTRACT

This thesis was undertaken to elaborate and develop the first specific HACCP model for the management of *ante* and *post mortem* quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*) produced in the continental farm "Fat-Steppes" (western Algeria). In doing so, various critical control points (CCP) have been identified and controlled throughout the breeding and commercialization phases.

During the breeding period, antibiotics residues, 17 α -methyl testosterone residues and physicochemical and microbiological quality of the water and livestock feed were evaluated. A relevant analytical strategy was developed based on a first microbiological screening method was improved and partially validated for the identification of tetracyclines and fluoroquinolones. Followed by a second LC-UV-MS method which was especially optimized for the identification and the quantification of oxolinic acid. A new method of extraction, compatible with an enzyme-immunoassay test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), was optimized for the detection of 17 α -methyltestosterone residues (MT) in fish's flesh, water and feed.

The nutritional profile of tilapia produced in Fat Steppes was characterized by determining its macronutrient composition, fatty acid and amino acid profile.

Subsequently, the temporal evolution of the hygienic quality, tilapia stored at 4 °C and 30 °C, was evaluated by a sensorial, microbiological (Total Viable Count and Enterobacteriaceae) and biochemical approach. Analysis of conjugated diene, hydroperoxides and TBARS "Thiobarbituric acid reactive substances" was applied to assess lipid oxidation. Analysis of Total Volatile Basic Nitrogen "TVB-N", trimethylamine "TMA" and biogenic amines were applied to assess bacterial and enzymatic proteolysis.

The obtained results have demonstrated satisfactory performance of the two techniques of antibiotic residues analysis. The detection capability (CC β) of the screening test is 0.75 times the Maximum Residue Limits (MRL) of oxolinic acid (OXO) and the limit of the chromatographic quantification LC/UV is MRL/20. The withdrawal of OXO is estimated for 8 days after treatment of six successive days with a dose of 12 mg/kg body weight. The new method of MT's extraction residues is satisfactory in terms of extraction efficiency (55 % for meat and 85 % for water) and linearity ($R^2 = 0.998$). The withdrawal of MT residues is estimated for two months after treatment with a dose of ≤ 65 mg MT / kg diet for 28 days, from the 10th day post-hatching. Microbiological thresholds of 10³ CFU/100 ml of fecal coliform and 3 x 10⁶ CFU/g of Total Viable Count are retained as criteria for good microbiological quality requirements of water and livestock feed, respectively. The Algerian tilapia is considered as a lean fish (± 0.33 % lipid) and high in protein (± 17.3 %).

ABSTRACT

The essential amino acid and polyunsaturated fatty acid profile is relatively interesting. The performance parameters of the new method HPTLC "High Performance Thin Layer Chromatography" developed for screening and quantification of six biogenic amines of interest are satisfactory in terms of linearity ($R^2 > 0.98$), accuracy ($> 84\%$), fidelity, and the limit of detection (LOD) of the test is $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of fish flesh. The results of organoleptic, microbiological and biochemical analysis are strongly and positively correlated and show that the shelf life of tilapia is limited to 12 h and five days of storage at 30°C and 4°C respectively. After these delays, the fish is rejected by the sensory appreciation and all critical thresholds are exceeded in this work. Values in the range of $6 \log \text{CFU g}^{-1}$ for total viable count and Enterobacteriaceae, $0.85 \text{ mg MDA kg}^{-1}$ wet weight, $35 \text{ mg TVB-N } 100 \text{ g}^{-1}$ of flesh, $8 \text{ mg TMA-N } 100 \text{ g}^{-1}$ of flesh, $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ putrescine and cadaverine are retained as microbiological and biochemical criteria, respectively.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, HACCP, oxolinic acid, 17α -methyltestosterone, biogenic amines, HPTLC, microbiological screening, TBARS, TMA, hydroperoxides, sensory analysis, TVB-N, conjugated diene, HPLC/UV/MS.

IL VAUT MIEUX ALLUMER UNE SEULE ET MINUSCULE
CHANDELLE QUE DE MAUDIRE L'OBSCURITE

(Proverbe chinois).

Remerciements

IL ME SERA TRES DIFFICILE DE REMERCIER TOUT LE MONDE CAR C'EST GRACE A L'AIDE DE NOMBREUSES PERSONNES QUE J'AI PU MENER CETTE THESE A SON TERME.

Je tiens tout particulièrement à exprimer toute ma gratitude au Professeur ABI -AYAD Sidi-Mohammed El-Amine directeur du Laboratoire d'Aquaculture et Bioremediation (*AQUABIOR*) de l'université d'Oran 1 (Algérie) de m'avoir intégré dans son équipe de recherche et d'avoir accepté d'être mon Directeur de Thèse (algérien). Je le remercie pour sa présence, sa rigueur, pour ces judicieux conseils et surtout pour sa confiance et son soutien (Il représente vraiment un grand frère pour moi).

Je tiens aussi à remercier du fond du cœur le Professeur SCIPPO Marie-Louise de m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (LADA) et surtout de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une Thèse en cotutelle et d'en être ma Directrice (belge). Je la remercie encore pour sa disponibilité, ses conseils et ses remarques percutantes qui m'ont permis d'avancer dans mon travail et dans ma carrière.

Je remercie vivement le Pr. BABA HAMED Mohammed EL Bey et le Pr. ALI MEHIDI Smail, membres de mon comité de thèse.

J'adresse mes remerciements au président (Pr. BOUTIBA Zitouni) et aux membres de jury " Pr. GILET Laurent (président du collège doctoral de l'Ulg), Pr. AIT YAHIA Dalila, Pr. DELCENSERIE Véronique, Pr. AUBOURG MARTINEZ Santiago Pedro, Pr. KESTEMONT Patrick et Pr. MELARD Charles" qui à deux reprises et malgré leurs préoccupations ont aimablement accepté d'expertiser mon travail et de m'honorer de leur présence pour débattre et animer mes deux défenses (privée et publique).

Je suis infiniment gré à Mr. DEGAND Guy (alias Général) pour ses précieux conseils, ses explications pertinentes, ses illustrations pratiques, sa disponibilité et son soutien qui m'a motivé au quotidien.

Remerciements

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à Mr. BROSE François (alias Grand-maître) pour sa disponibilité, son initiation pratique à différentes manipulations, pour sa sympathie et ces judicieux conseils.

Mes remerciements vont également au Docteur DOUNY Caroline pour son initiation théorique et pratique à l'HPLC et à la GC/MS, pour sa disponibilité et son appui lors des analyses chromatographiques.

Un grand merci au Docteur Dang Pham Kim (mon cher ami vietnamien) pour son initiation à la méthode du screening microbiologique.

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude au Pr. CLINQUART Antoine et Pr. DAUBE Georges pour leurs judicieux conseils, leurs collaborations en technologie et en microbiologie alimentaire respectivement et surtout pour leur amabilité.

Un grand merci au Dr. RODRIGUES Anna de m'avoir assisté lors des analyses microbiologiques.

Un grand merci au Pr. MELARD Charles et à tout le staff technique et d'encadrement du CEFRA (Dr. ROUGEOT Carole, Dr. GENNOTTE Vincent, Mr. Prignon Christian et Mr. Dennie) pour leur appui scientifique durant les cinq mois d'expérimentation de l'inversion sexuelle des juvéniles de tilapia.

Je dois admettre que les conditions de travail au sein des laboratoires LADA et CEFRA sont très favorables et salutaires, une bonne ambiance règne et le personnel est très sympathique.

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude au Pr. GUSTIN Pascal, responsable du Laboratoire de Pharmacologie à l'ULg, et en particulier à Mr. La Duong Duc pour l'initiation à la méthode HPTLC lors des analyses des amines biogènes.

Je témoigne aussi ma gratitude au Professeur FARNIR Frederic et au Docteur MOULA Nassim (mon cher compatriote) pour leurs disponibilités et

Remerciements

leurs dévouements pour les analyses statistiques des résultats obtenus dans le cadre de cette recherche.

Je remercie également Dr. DELAHAUT Philippe (Directeur scientifique du CER-groupe Marloie-Belgique) pour sa collaboration et son initiation technique des analyses des résidus d'hormones par ELISA.

Un grand merci pour l'équipe d'AQUABIOR (Enseignants et doctorants) pour leur soutien morale et encouragements.

Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Enfin, un grand merci à mon épouse pour avoir supporté mon stress et mes sauts d'humeur tout au long de cette longue épreuve scientifique. Merci surtout pour son encouragement, son soutien et son affection. De gros bisous à mes deux anges gardiens "Amine & Akram" qui rayonnent mes journées de joie et de bonheur.

DEDI CACES

A mon défunt père

A ma famille (mère, frères, belles-sœurs, neveux & nièces)

A mon épouse

A mes enfants

A mes amis.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	
ABSTRACT	
LISTE DES FIGURES, SCHEMA, PLANCHE & PLAN	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABRÉVIATIONS	
AVANT PROPOS	
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I. LE TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>)	10
1. Introduction	10
2. Position systématique	11
II. QUALITE DE LA CHAIR DU POISSON	11
1. Généralités	11
1.1. Structure physique	12
1.2. Composition chimique	12
a. Composés lipidiques	12
b. Composés protéiques	14
c. La fraction azotée non protéique	15
d. Vitamines et sels minéraux	15
2. Altération du poisson	15
2.1. Altération organoleptique	15
2.2. Altération biochimique	18
2.2.1. Autolyse et catabolisme de nucléotide	18
2.2.2. Oxydation des lipides	18
a. La lipolyse	18
b. La peroxydation lipidique	19
2.2.3. Composés volatils	21
2.2.4. Amines biogènes	22
2.3. Qualité microbiologique	26
III. SYSTÈME DE GESTION DE LA QUALITÉ	28
1. Introduction	28
2. Classification	29
a. La qualité hygiénique	29
b. La qualité nutritionnelle	29
c. La qualité organoleptique	30
3. Le système HACCP	30
IV. MEDICAMENTS VETERINAIRES	34
1. L'acide oxolinique	36
1.1. Structure	36
1.2. Propriétés physicochimiques	36
1.3. Mécanisme d'action	36

TABLE DES MATIERES

1.4.	Pharmacocinétique chez le poisson	38
1.4.1.	Résorption	38
1.4.2.	Distribution	38
1.4.3.	Biotransformation	38
1.4.4.	Elimination	39
1.5.	Dose et toxicité	39
1.6.	Méthodes de contrôle des résidus d'antibiotiques chez le poisson	39
1.6.1.	Le screening (dépistage)	39
1.6.2.	La confirmation (quantification)	40
2.	Hormone (17 α -méthyle testostérone)	41
	DEUXIEME PARTIE : MATERIELS & METHODES	45
I.	DEMARCHE HACCP	45
1.	Evaluation des programmes préalables à L'HACCP	45
2.	Application du système HACCP	45
2.1.	Etapes préliminaires de l'HACCP	45
2.1.1.	Définir le champ de l'étude	45
2.1.2.	Caractérisation du tilapia (<i>O. niloticus</i>) produit à Fat-Steppes	45
a.	Composition et caractéristiques chimiques de la chair du tilapia	45
b.	Profil en acides gras	46
c.	Profil en acides aminés	46
1)	Hydrolyse acide des protéines	47
2)	Oxydation performique avant l'hydrolyse acide	47
3)	Dosage du tryptophane après hydrolyse alcaline des protéines	48
2.1.3.	Etablissement du diagramme de production	48
2.2.	Les 07 principes du système HACCP	49
2.2.1.	Analyse des dangers (principe 1)	49
2.2.2.	Détermination des Points critiques de Contrôle (PCC) (Principe 2)	50
2.2.3.	Maitrise des PCCS	51
a)	Fixation des limites critiques pour chaque PCC identifié (Principe 3)	51
b)	Etablir un système de surveillance des CCP (Principe 4)	51
c)	Etablir un plan d'actions correctives	51
d)	Vérifier le système HACCP	51
II.	EVALUATION DES DANGERS MAJEURS DE LA PHASE ANTE MORTEM	52
1.	Méthode de détermination des résidus d'antibiotiques	52
1.1.	Expérience de contamination du tilapia par l'acide oxolinique	52
1.1.1.	Préparation et administration de l'antibiotique	53
a.	L'aliment	53
b.	Préparation de l'aliment médicamenteux	53
c.	Administration du médicament	54
1.1.2.	Prélèvements	54

TABLE DES MATIERES

a.	Prélèvement sanguin	54
b.	Prélèvement de la chair	54
1.2.	Screening microbiologique pour la détection des résidus d'antibiotiques dans la chair du tilapia	55
1.2.1.	Réactifs	55
1.2.2.	Préparation des solutions	55
1.2.3.	Préparation des milieux de culture microbiologique	55
1.2.4.	Extraction des résidus d'antibiotiques	56
1.2.5.	Incubation	56
1.2.6.	Lecture	57
1.3.	Evaluation des paramètres de performance du screening microbiologique	57
1.4.	Analyse de confirmation par chromatographie LC-UV-MS des résidus d'acide oxolinique dans la chair de tilapia	58
1.4.1.	Réactifs et matériels	58
1.4.2.	Préparation des solutions	58
1.4.3.	Extraction	59
1.4.4.	Purification	60
1.4.5.	Injection	60
1.4.6.	Calcul des résultats	61
1.5.	Evaluation des paramètres de performance de la méthode LC-UV	62
✚	Justesse	62
✚	Fidélité	62
✚	Limite de quantification	63
✚	Limite de détection	63
✚	Linéarité	63
✚	Spécificité	63
✚	Sélectivité	63
2.	Méthode du dosage de la 17 α -méthyle testostérone (MT)	63
2.1.	Expérience du traitement hormonal des juvéniles de tilapias	64
2.2.	Monitoring des résidus d'MT par ELISA	66
2.2.1.	Préparation des solutions	66
2.2.2.	Protocole	66
a.	Eau	66
▪	Extraction	66
▪	Purification	66
b.	Chair	67
▪	Extraction	67
▪	Purification	67
2.2.3.	Procédure du test ELISA	67
3.	Analyse microbiologique et physicochimique de l'eau d'élevage	68
3.1.	La qualité microbiologique	68
3.1.1.	Bactéries indicatrices	68

TABLE DES MATIERES

3.1.2.	Bactéries pathogènes	70
3.2.	La qualité physicochimique	71
4.	Analyse microbiologique et chimique de l'aliment d'élevage	72
III.	APPRECIATION DES DANGERS DE LA PHASE POST MORTEM ET EVALUATION DE LA FRAICHEUR	72
1.	Détermination du degré d'oxydation des lipides	72
1.1.	Extraction des lipides	73
1.2.	Diènes conjugués	73
1.3.	Hydroperoxydes	74
1.4.	TBARS	75
2.	Détermination des indices de la protéolyse	75
2.1.	ABVT & TMA	76
2.2.	Amines biogènes	77
2.2.1.	Réactifs	77
2.2.2.	Préparations des solutions	77
2.2.3.	Protocole	78
a.	Extraction	78
b.	Dansylation	78
c.	Dépôt & révélation	79
2.2.4.	Evaluation des paramètres de performance de la méthode HPTL	80
3.	Analyse microbiologique du tilapia	80
4.	Analyse du pH	81
5.	Analyse sensorielle	81
IV.	ANALYSE STATISTIQUE	83
1.	Analyse statistique des résultats des résidus d'acide oxolinique	83
2.	Analyse statistique des résultats des résidus de la 17 α -MT	83
3.	Analyse statistique des résultats des paramètres physico-chimique, organoleptique et microbiologique	83
	TROISIEME PARTIE : RESULTATS	84
I.	DEMARCHE HACCP	84
1.	Evaluation des programmes préalables à L'HACCP	84
2.	Application du système HACCP	87
2.1.	Caractérisation du tilapia produit dans l'Ouest algérien	87
2.1.1.	Composition et caractéristiques chimiques de la chair du tilapia	87
2.1.2.	Profil en acides aminés	87
2.1.3.	Profil en acides gras	88
2.2.	Etablissement du diagramme de production	90
II.	SURVEILLANCE DES DANGERS PENDANT LA PHASE ANTE-MORTEM	91
1.	Résidus d'antibiotique	91
1.1.	Adaptation d'une méthode de screening microbiologique pour la détection de résidus de fluoroquinolones et de tétracyclines dans la chair de tilapia – mini validation	91

TABLE DES MATIERES

1.1.1.	Contrôle de qualité du test microbiologique	91
1.1.2.	Etude préliminaire de la capacité de détection du test microbiologique (CCβ)	91
1.1.3.	Optimisation de la capacité de détection du test microbiologique (CCβ)	92
1.1.4.	Evaluation des paramètres de performance de la méthode microbiologique	93
1.2.	Mise au point d'une méthode de confirmation chromatographique de l'acide oxolinique par HPLC-UV	94
1.2.1.	Optimisation de la méthode de détection LC-UV-MS	94
1.2.2.	Evaluation des paramètres de performance de la méthode LC-UV	95
1.3.	Analyse des échantillons de tilapia contaminés par l'acide oxolinique	99
1.3.1.	Caractéristiques des deux lots de Tilapia contaminés par de l'acide oxolinique	99
1.3.2.	Screening microbiologique	99
1.3.3.	Quantification de la concentration en acide oxolinique dans la chair et le sérum du tilapia par LC-UV	101
1.3.4.	Analyse statistique des résultats des résidus d'acide oxolinique	104
2.	17α-méthyle testostérone (MT)	105
2.1.	Paramètres physico-chimiques de l'eau	105
2.2.	Taux de mortalité	105
2.3.	Effet androgénique de la MT sur le sexe des tilapias (<i>O. niloticus</i>)	105
2.4.	Résidus de la MT dans la chair de tilapia et à partir de l'eau rejetée	106
2.4.1.	Optimisation du protocole d'extraction de la MT	106
2.4.2.	Analyse des échantillons	107
3.	Qualité microbiologique et physicochimique de l'eau et de l'aliment d'élevage	108
III.	SURVEILLANCE DES DANGERS PENDANT LA PHASE POST MORTEM	111
1.	Evolution temporelle de la qualité post mortem du tilapia (<i>O. niloticus</i>)	111
1.1.	Qualité sensorielle	111
1.2.	Qualité microbiologique	113
1.3.	Evolution de la qualité biochimique de la chair de tilapia au cours de sa conservation	115
1.3.1.	pH	115
1.3.2.	Oxydation des lipides	116
a.	Diènes conjugués	116
b.	Hydroperoxydes & TBARS	116
1.3.3.	Protéolyse bactérienne et enzymatique	118
a.	ABVT & TMA-N	118
b.	Amines biogènes	119
1)	Paramètres de performance de la méthode	119
2)	Dosage	122
2.1)	Screening de six amines biogènes dans la chair de tilapia	122
2.2)	Quantification	124
IV.	ANALYSE & MAITRISE DES PCC (SYNTHESE)	126
1.	Analyse des dangers et détermination des PCC de la production du tilapia à Fat-Steppes	126
2.	Maitrise des PCC	129

TABLE DES MATIERES

	QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION	132
1.	Démarche HACCP	132
2.	Stratégie analytique des résidus d'antibiotiques	136
3.	Evaluation des résidus de la 17 α -méthyle testostérone	143
4.	Qualité microbiologique et chimique des aliments et des eaux d'élevage	147
5.	Evolution temporelle de la qualité du tilapia conservé à 30°C et à 4°C	151
5.1.	Qualité sensorielle	151
5.2.	Qualité microbiologique	151
5.3.	Qualité biochimique	153
a.	pH	153
b.	Oxydation lipidique	153
c.	Protéolyse bactérienne et enzymatique	155
	CINQUIÈME PARTIE : CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	160
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163
	ANNEXES	197

LISTE DES FIGURES, SCHEMA, PLANCHE & PLAN

Figure 1 : Carte représentant les 07 pôles d'activités aquacoles en Algérie	02
Figure 2 : Production aquacole mondiale des principaux groupes d'espèces de poissons en 2010 (FAO, 2012).	03
Figure 3 : <i>Tilapia du Nil (Oreochromis niloticus)</i> (Linnæus, 1766).	11
Figure 4 : Evolution typique des scores sensoriels selon la méthode QIM (Cyprian, 2009).	17
Figure 5 : Auto-oxydation des lipides polyinsaturés (Al-Sayed, 2007).	20
Figure 6 : Cinétique d'oxydation des acides gras insaturés (Gardner, 1987).	21
Figure 7 : Devenir des amines biogènes dans le tractus intestinal humain (Kantaria & Gokani, 2011).	24
Figure 8 : Nitrosation des amines du poisson (Prester, 2011).	24
Figure 9 : Changements typiques dans la flore totale (TVC), les organismes spécifiques d'altération (SSO) et les métabolites produits pendant la conservation des produits de la mer (Dalgaard, 2000).	28
Figure 10 : Etapes et principes du système HACCP (Codex Alimentarius, 1997).	32
Figure 11: Exemple d'arbre de décision selon le Codex Alimentarius (1997).	34
Figure 12 : Structure de la molécule d'acide oxolinique (Paschoal <i>et al.</i> , 2009).	36
Figure 13 : Structure de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, cibles de l'acide oxolinique (Hooper, 2002).	37
Figure 14 : Structure chimique de la 17 α -méthyle testostérone (Barry <i>et al.</i> , 2007).	41
Figure 15 : Tank équipé utilisé pour l'expérience de contamination du tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) avec de l'acide oxolinique.	53
Figure 16 : Spoteur automatique CAMAG-Linomat 5 (ULg, 2012).	79
Figure 17 : Densitomètre CAMAG TLC Scanner 3 (ULg, 2012).	79
Figure 18 : Diagramme de production du tilapia " <i>O. niloticus</i> " selon la démarche HACCP (étape 4).	90
Figure 19 : Résultats du screening microbiologique (pH 6) de chair de tilapia contaminée avec 100 μ g/kg d'acide oxolinique.	93
Figure 20 : Courbes de calibration moyennes réalisées à partir de la chair du tilapia fortifiée avec des concentrations croissantes en acide oxolinique, détectée par UV et MS.	94
Figure 21: Chromatogramme obtenu lors de l'analyse par LC-MS de la chair du tilapia fortifiée avec de l'acide oxolinique à la concentration de LMR/20 (5 μ g/kg).	95
Figure 22: Courbes de calibration moyennes réalisées à partir de sérum et de la chair du tilapia dopé avec des concentrations croissantes en acide oxolinique.	97
Figure 23 : Chromatogramme obtenu lors de l'analyse par HPLC-UV de la chair de tilapia contenant de l'acide oxolinique à une concentration de 50 μ g/kg.	98
Figure 24 : Chromatogrammes HPLC-UV des témoins de chair et de sérum du tilapia.	98
Figure 25: Résultat du screening microbiologique des témoins de la chair du tilapia : exemple d'une boîte parmi les 20 tests.	99
Figure 26 : Résultat du screening microbiologique de la chair du tilapia du lot 1 de l'expérience de contamination par de l'acide oxolinique.	100

LISTE DES FIGURES, SCHEMA, PLANCHE & PLAN

Figure 27 : Résultat du screening microbiologique de la chair du tilapia du lot 2 de l'expérience de contamination par de l'acide oxolinique.	101
Figure 28 : Concentration en acide oxolinique ($\mu\text{g}/\text{kg}$), déterminée par LC-UV, dans la chair et le sérum des tilapias issus du lot 1 de l'expérience de contamination.	102
Figure 29 : Concentration en acide oxolinique ($\mu\text{g}/\text{kg}$), déterminée par LC-UV, dans la chair et le sérum des tilapias issus du lot 2 de l'expérience de contamination.	103
Figure 30 : Corrélation entre les résultats du screening et de l'analyse LC-UV des tilapias du lot 1 & lot 2 issus de l'expérience de contamination avec l'acide oxolinique.	104
Figure 31 : Résultat du sexage des lots expérimentaux de juvéniles de Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) suite à une inversion sexuelle à la méthyle testostérone.	106
Figure 32 : Courbe de calibration de la 17 α -méthyle testostérone du test ELISA.	107
Figure 33 : Concentration résiduelle post-traitement de la 17 α -méthyle testostérone ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans la chair du tilapia du Nil (<i>O. niloticus</i>).	108
Figure 34 : Evolution temporelle de la qualité sensorielle du tilapia (<i>O. niloticus</i>) conservé à 30°C et à 4°C.	112
Figure 35 : Evolution temporelle de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et des Entérobactéries (ENT) du tilapia (<i>O. niloticus</i>) conservé à 4°C (A) et 30°C (B).	114
Figure 36 : Evolution temporelle du pH Post mortem du tilapia (<i>O. niloticus</i>) conservé à 4°C et à 30°C.	115
Figure 37 : Evolution temporelle des diènes conjugués (Indice Diène) chez le tilapia du Nil (<i>O. niloticus</i>) conservé à 4°C et 30°C.	116
Figure 38 : Changement temporel des concentrations des hydroperoxydes (exprimés en équivalents d'hydroperoxydes de cumène) et des TBARS (exprimés en mg équivalent malonaldéhyde par kg de poids humide) des échantillons de tilapia (<i>O. niloticus</i>) conservés à 4°C (A) et 30°C (B).	117
Figure 39 : Changement temporel de l'ABVT (A) et du TMA-N (B) des échantillons de tilapia entier (<i>O. niloticus</i>) conservés à 4°C et 30°C.	118
Figure 40 : Séparation et migration des amines biogènes dansylées sur plaque HPTLC – Silica gel G60 en utilisant la phase mobile (chloroforme- diéthyle éther- triéthylamine (4:1:1)).	119
Figure 41 : Limite de détection de la méthode HPTLC réalisées à partir de concentrations croissantes en pool de standards des six amines biogène.	120
Figure 42 : courbes de calibration des six amines biogènes réalisées en standards de putrescine (PU), cadavérine (CD), spermidine (SD), histamine (HI), spermine (SM) et tyramine (TY).	120
Figure 43: Résultats d'analyse des amines biogènes par HPTLC du lot de tilapia conservé à température ambiante (30°C) (0 heure – 24 heures).	123
Figure 44 : Résultats d'analyse des amines biogènes par HPTLC du lot de tilapia conservé à 4°C (0 heure - J5).	123
Schéma 1 : Schéma représentatif des expériences réalisées.	44
Plan 1 : Plan de la ferme de tilapiculture "Fat-Steppes" à l'Ouest algérien.	86
Planche 1 : Analyse organoleptique du tilapia (<i>O. niloticus</i>) conservé à 30°C et 40°C.	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Pêches et aquaculture dans le monde: production et utilisation (FAO, 2014).	01
Tableau II : Organisation des pôles d'activité aquacole (programme quinquennal 2009-2014) en fonction de l'espèce de poisson, de la zone géographique et des ressources hydriques.	02
Tableau III : Microflore dominante et bactéries d'altération identifiées sur du poisson blanc frais (cabillaud) au moment de son altération (Huss, 1994).	27
Tableau IV : Elément permettant de déterminer l'exactitude, la spécificité et la sensibilité de la méthode microbiologique (Gaudin & Sanders, 2005).	58
Tableau V : Gamme de concentrations en acide oxolinique utilisée pour la courbe de calibration (réalisée en matrice).	59
Tableau VI : Programme du gradient d'élution de l'acide oxolinique (HPLC).	61
Tableau VII : Paramètres optimisés de la détection par spectrométrie de masse (MS).	61
Tableau VIII : Concentrations d'amines biogènes pour la préparation des courbes étalons.	78
Tableau IX : Schéma de la Méthode d'Index de Qualité (QIM) pour l'analyse sensorielle du Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) combinant le règlement (CE) N°2406/96 et la méthode de Baixas-Nogueras <i>et al.</i> , 2003).	82
Tableau X : Résultats de la composition chimique du tilapia produit dans l'Ouest algérien comparés à ceux de la littérature.	87
Tableau XI : Profil en acides aminés du tilapia (<i>O. niloticus</i>) produit à Fat-Steppe comparé à ceux de la littérature (g/100 g MF).	88
Tableau XII : Profil en acides gras et en lipides totaux du tilapia (<i>O. niloticus</i>) produit à Fat-Steppes comparé au tilapia produit au CEFRA et à ceux de la littérature (% des acides gras totaux)	89
Tableau XIII : Test préliminaire de la capacité de détection "CCβ" de huit antibiotiques dans la chair de tilapia en appliquant la méthode de Dang <i>et al.</i> (2010).	91
Tableau XIV : Détermination de la capacité de détection par la méthode microbiologique après adaptation.	92
Tableau XV: Performances de la méthode microbiologique adaptée.	93
Tableau XVI : Justesse et fidélité de la méthode LC-UV (n = 3).	96
Tableau XVII: Ecart du TRR de l'acide oxolinique dans la chair et le sérum du tilapia au TRR moyen de la courbe de calibration.	97
Tableau XVIII : Dénombrement des bactéries indicatrices à partir des échantillons d'eaux douces prélevées de la ferme aquacole "Fat-Step".	108
Tableau XIX : Numération des bactéries pathogènes à partir des échantillons d'eaux douce prélevées de la ferme aquacole "Fat-Steppes"	109
Tableau XX : Résultats de l'analyse microbiologique des aliments d'élevage (utilisés à Fat-Steppes et au laboratoire AQUABIOR) selon la norme algérienne NA 6115.	110
Tableau XXI : Analyse physicochimique de l'eau douce de tilapiculture.	111
Tableau XXII : Les équations des courbes étalons et leurs coefficients de corrélation correspondants des six amines biogènes.	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau XXIII : Justesse et fidélité de la méthode HPTLC développée selon la décision 2002/657/CE.	121
Tableau XXIV : Exactitude de la méthode HPTLC développée selon la décision 2002/657/CE.	122
Tableau XXV : Résultats du dosage des amines biogènes par HPTLC dans la chair de tilapia conservé à température ambiante (30°C).	124
Tableau XXVI : Résultats du dosage des amines biogènes par HPTLC dans la chair de tilapia conservé à 4°C.	125
Tableau XXVII : Analyse des dangers et détermination des PCCs de la production et de la commercialisation de tilapias (<i>O. niloticus</i>) produits à Fat-Steppes.	126
Tableau XXVIII : Maitrise des PCCs de la production et de la commercialisation de tilapias (<i>O. niloticus</i>) produits à Fat-Steppes.	130

LISTE DES ABREVIATIONS

ABs :	Amines Biogènes
ABVT :	Azote Basique Volatil Totale.
ADP :	Adénosine Diphosphate
AFNOR :	Association Française de normalisation
AGPI :	Acides Gras Polyinsaturés
AMP :	Adénosine Monophosphate
ANOVA :	Analyse des variances
ANP :	Azote Non Protéique
AQUABIOR :	Laboratoire d'Aquaculture et de Bioremediation (Algérie)
ATP :	Adénosine Triphosphate
BHT:	Butyl-hydroxy-toluène
BPA:	Bonne pratiques aquacoles
BPH:	Bonnes pratiques d'hygiène
BPV:	Bonnes pratiques vétérinaires
BPF:	Bonnes pratiques de fabrication
CCB :	Capacité de détection du test de screening microbiologique
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CE :	Communauté Européenne
CEFRA :	Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (Belgique)
CPG :	Chromatographie Phase Gazeuse
CuOOH :	Hydroperoxyde de cuméne
DG :	Diglycéride
DHA :	Acide Docosahexaénoïque
DLUO :	Date Limite d'Utilisation Optimale
DMA :	Diméthylamine
EPA :	Acide Eicosapentaénoïque
Eq :	Equivalents
FA :	Formaldéhyde
FAO:	Food and Agriculture Organization
FDA :	Food and Drug Administration
FOX :	Ferrous Oxidation Xylenol orange
GC :	Chromatographie Gazeuse
HACCP:	Hasard Analysis Critical Control Point
HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Performance
HPTLC :	High Performance Thin Liquide Chromatography
Hx :	Hypoxanthine
IAB :	Indice d'Amines Biogènes
ICMSF :	International Commission on Microbiological Specifications for Foods

LISTE DES ABREVIATIONS

IMP :	Inosine Monophosphate
IMRAD :	acronym of Introduction, Methods, Results and Discussion
Ino :	Inosine
IQ :	Index de Qualité
ISO :	International Standard Organization
J.O :	Journal Officiel
LADA :	Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (Belgique)
LOD :	Limites de détermination
LOQ :	Limites de quantifications
LT :	Lipides Totaux
MDA :	Malonaldehyde
MG :	Monoglycérides
M.H :	Matière Humide
M.S :	Matière Sèche
MS :	Spectrométrie de masse
NA :	Norme Algérienne
NH₃ :	Ammoniac
OTMA :	Oxyde de Triméthylamine
OMS :	Organisation Mondiale de Santé
OXO :	Acide oxolinique
PCC :	Point Critique de Contrôle
PLA2 :	Phospholipase A2
PLC :	Phospholipase C
PNDA :	Plan National du Développement Agricole
PRP :	Programmes Préalables (prérequis) à l'HACCP
QIM :	Quality Index Method
SAS :	Statistical Analysis System
SAA :	Stéroïdes Anabolisants Androgènes
SPSS :	Statistical Package for Social Sciences
SSO :	Specific Spoilage Organisms
TBA :	Acide Thiobarbiturique
TBARS :	Substance réactive à l'acide thiobarbiturique
TG :	Triglycéride
TMA :	Triméthylamine
TMAO :	Oxyde de Triméthylamine
UV :	Ultra-Violet

AVANT PROPOS

Cette thèse a été réalisée sous le régime d'une Cotutelle entre l'Université d'Oran 1 (Algérie) – Facultés des Sciences et de la Vie – Département de Biotechnologie – Laboratoire d'Aquaculture et Bioremediation (*AQUABIOR*) sous la direction du Professeur **ABI AYAD Sidi-Mohammed El-Amine &** l'Université de Liège (ULg) (Belgique) – Faculté de Médecine Vétérinaires – Département des Sciences des Denrées Alimentaires – Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (LADA) sous la direction du Professeur **SCIPPO Marie-Louise**.

Afin de concrétiser toutes les expérimentations, nous avons collaboré avec différentes structures universitaires à savoir :

✚ Le Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (ULg), sous la responsabilité du Professeur **DAUBE Georges**.

✚ Le Laboratoire de Technologie des Denrées Alimentaire de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (ULg), sous la responsabilité du Professeur **CLINQUART Antoine**.

✚ Le Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (**CEFRA– Thiange**) de l'université de Liège (ULg), sous la responsabilité du Professeur **MELARD Charles**.

✚ Le laboratoire de pharmacologie, pharmacothérapie et toxicologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (ULg), sous la responsabilité du Professeur **GUSTIN Pascal**.

✚ Le laboratoire de Chimie Analytique, Unité de Chimie Biologique, de l'Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, sous la responsabilité du Professeur **WATHELET Bernard**.

Ainsi qu'une structure privée:

✚ Le laboratoire d'hormonologie "CER Groupe" (Marloie, Belgique), sous la responsabilité du Docteur **DELAHAUT Philippe**.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le poisson est une denrée alimentaire très appréciable pour sa valeur gustative et nutritive. Il constitue une source précieuse de protéines aisément digestibles à valeur biologique élevée. Il est aussi un excellent vecteur d'oligo-éléments et de vitamines. Ce produit aquatique est une source riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne de la série n-3 et n-6 qui sont fortement recommandés en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Fontagné-Dicharry & Médale, 2010).

L'aquaculture mondiale est un secteur dynamique en plein essor. Contrairement à la pêche qui stagne autour de 90 millions de tonnes par an, l'aquaculture connaît une croissance annuelle de près de 8,6 %, ce qui est bien supérieur à la croissance de la production animale terrestre (FAO, 2014). Pour l'année 2012, la production mondiale de poissons de consommation issus de l'aquaculture a atteint 66,6 millions de tonnes (FAO, 2014) parmi les 158 millions de tonnes produites au total entre les pêches de capture et l'aquaculture (Tableau I).

L'Algérie se distingue parmi les pays méditerranéens par sa très faible production en produits de la pêche (< 3 million de tonnes). Bien que le ratio alimentaire soit passé de 3,02 en 1999 à 5,4 kg/hab/an en 2010 (FAO, 2012), cela reste bien en dessous de la moyenne mondiale, qui a été estimée en 2012 à 19,2 kg/hab/an (FAO, 2014) et qui ne cesse d'augmenter (Tableau I).

Tableau I : Pêches et aquaculture dans le monde: production et utilisation (FAO, 2014).

Année	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Production (millions de tonnes)						
Pêche	90,8	90,1	90,1	89,1	93,7	91,4
Aquaculture	49,9	52,9	55,7	59,0	62,0	66,6
Total de la production mondiale	140,7	143,0	145,8	148,1	155,7	158,0
Utilisation *						
Consommation humaine (kg/an)	117,3	120,9	123,7	128,2	131,2	136,2
Population (milliards)	6,7	6,7	6,8	6,9	7,0	7,1
Ratio alimentaire (kg/habitant/an)	17,6	17,9	18,1	18,5	18,7	19,2

* Les données relatives à 2012 pour cette section sont des données provisoires.

La couverture du déficit en poisson en Algérie ne peut être assurée par la pêche maritime du fait de l'étroitesse de son plateau continental, l'ancienneté de sa flotte de pêche et par l'escarpement de sa côte. La vulgarisation de l'aquaculture ainsi que l'introduction sur le marché national de nouvelles espèces de poissons semblent être de très bonnes résolutions pour remédier à ce manque. Dans cette perspective, un programme quinquennal 2009-2014

INTRODUCTION

a été planifié. Ce dernier se base principalement sur le lancement de sept pôles d'activités aquacoles (désignées par des lettres de A à G sur la Figure 1 et dans le Tableau II) et sur l'exploitation de différentes ressources hydriques à travers le territoire national.

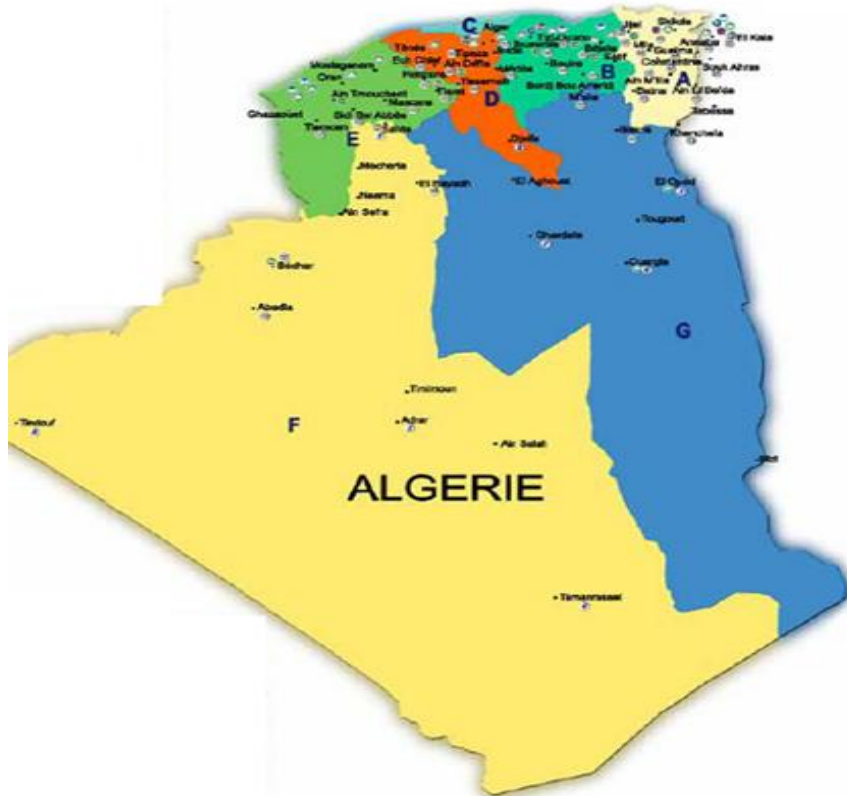


Figure 1 : Carte représentant les 07 pôles d'activités aquacoles en Algérie.

Tableau II : Organisation des pôles d'activité aquacole (programme quinquennal 2009-2014) en fonction de l'espèce de poisson, de la zone géographique et des ressources hydriques.

Pôle d'activité aquacole	Ressources hydriques	Espèces à développer	Province	Région
A	Sites littoraux, lacs et rivières, barrages, zones humides, retenues collinaires, chott, étangs	Algues, loup de mer, daurade, moule, huitre, anguille, mullet, carpe et truite	Guelma, Souk-Ahras, OumEl-bouagui, Tébessa, Khenchla et Constantine	Nord-est
B	Lacs naturels, oueds, barrages, retenues collinaires, chott, étangs	Carpe argentée et mullet	Msila, Bordj Bou Arreridj, Sétif, Batna, Mila, Bouira	Hauts-plateaux de l'est
C	Sites littoraux, eau des rejets thermoélectriques, retenues collinaires	loup de mer, daurade, moule	Ain Defla, Médéa, Djelfa, Tissemsilt, Blida	Centre
D	Sites littoraux, lacs naturels et oueds, barrage et retenus collinaires	Carpe argentée, carpe royale, mullet, sandre, truite, moule et tilapia	Relizane, Mascara, Tiaret	Hauts-plateaux du centre
E	Sites littoraux, lacs naturels et oueds, barrage et retenus collinaires, étangs	Moule, carpe argentée, mullet, tilapia	Sidi Bel Abbas, Saida, Naâma	Nord-ouest et hauts-plateaux de l'ouest
F	Barrage et retenus collinaires, ressources en eau des zones semi-arides, canaux d'irrigation	Tilapia, silure glane	Bechar, El Bayad, Adrar, Tindouf, Tamanraset	Sud-ouest
G	Chott, ressources en eau des zones semi-arides, canaux d'irrigation, retenues collinaires	Tilapia, artemia, algues	Biskra, El Oued, Ouargla, Laghouat, Ghardaia, Illizi	Sud-est

INTRODUCTION

Le Tableau II résume les différentes orientations en matière du choix de l'espèce de poissons ou d'algues à cultiver en Algérie en fonction du biotope correspondant. Une enveloppe financière conséquente a été allouée au secteur de la pêche et de l'aquaculture. De plus, le secteur privé a été privilégié par la concession de terrains pour un dinar symbolique et par la subvention étatique pour la conception et l'aménagement de nouvelles fermes aquacoles dans le cadre du Plan National du Développement de l'Aquaculture (PNDA).

Parmi les espèces de poissons dulcicoles introduites en Algérie, le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) représente l'espèce de choix pour promouvoir l'aquaculture et prévoir un développement durable. Grâce à ses attributs, à savoir la rusticité, une reproduction facile et rapide en captivité, un régime alimentaire basique au niveau le plus bas de la chaîne alimentaire (phytoplancton et détritus) et une valeur gustative et nutritive intéressante (El-Sayed, 2006 ; Lazard, 2009). En outre, les filets du tilapia sont quasiment dépourvus d'arêtes, ce qui devrait séduire davantage les consommateurs. Cette espèce de poisson a fait ses preuves dans plusieurs pays du monde. Le groupe des tilapias se classe au deuxième rang après le groupe des carpes avec une production mondiale dépassant les 3,5 millions de tonnes en 2010 (FAO, 2012) (Figure 2).

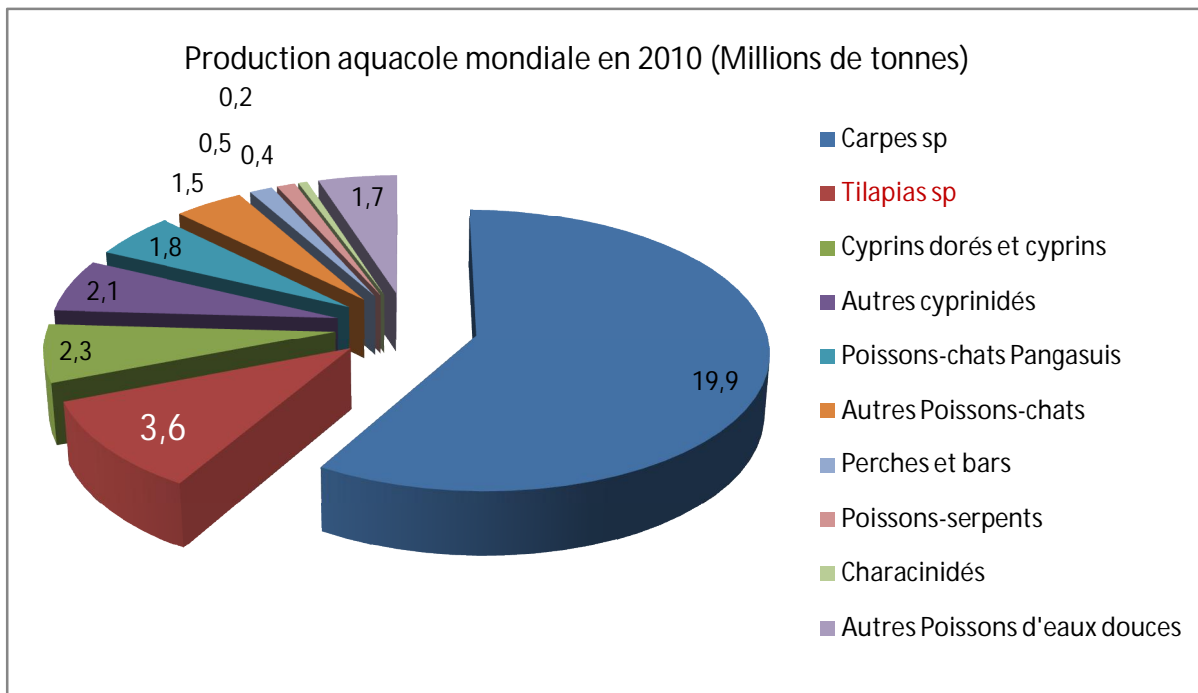


Figure 2 : Production aquacole mondiale des principaux groupes d'espèces de poissons en 2010 (FAO, 2012).

INTRODUCTION

Toutefois, en Algérie peu de fermes aquacoles ont pu démarrer une réelle production en raison de problèmes techniques et du manque de professionnalisme dans ce nouveau créneau de production animale. Dans l'Ouest algérien, parmi les deux fermes aquacoles continentales de tilapiculture existantes, une seule ferme "Fat-Steppes" (opérationnelle depuis 2008) a pu réaliser un stock conséquent d'alevins d'*Oreochromis niloticus* (un million) et atteindre une production de 100 tonnes par an. Cette exploitation aquacole fonctionne selon un rythme saisonnier (entre le mois d'avril et le mois d'octobre) et a permis, jusqu'en 2012, l'approvisionnement régulier de deux fermes aquacoles en alevins de tilapia avant leur faillite et fermeture définitive. Ces deux fermes aquacoles sont "Aquasaline" à Relizane (Ouest- algérien) et "Moulay" à Ouargla (Sud-est algérien). La ferme de tilapiculture Fat-Steppes a également contribué à l'ensemencement annuel de plusieurs bassins appartenant à des agriculteurs des wilayas (provinces) de l'Ouest algérien à des fins d'élevage aquacole.

La tilapiculture a recourt aux médicaments vétérinaires à savoir les antibiotiques et les hormones. L'antibiothérapie demeure incontournable dans les élevages aquacoles et piscicoles pour limiter l'impact économique des bactérioses (Hernandez Seranno, 2005 ; Kümmerer, 2009). Les antibiotiques sont utilisés à titre préventif pendant les phases critiques (stades précoces, transferts des poissons) mais aussi chez des animaux en croissance (Nicolas *et al.*, 2007). Il a été démontré que quelques antibiotiques, tel que la flavomycine, l'oxytetracycline et le florfenicol, ont été également utilisés comme des promoteurs de croissance chez le tilapia (He *et al.*, 2010 ; Reda *et al.*, 2013).

L'hormonothérapie est une pratique fiable et courante pour la masculinisation des juvénile de tilapia par l'utilisation de la 17 α -méthyle testostérone. Cette dernière est bien connue pour son effet anabolisant et androgénique chez le tilapia du Nil (Celik *et al.*, 2011). En Algérie, les pratiques d'élevage ainsi que les pratiques vétérinaires sont anarchiques et le contrôle officiel demeure élémentaire. Les médicaments vétérinaires sont facilement disponibles à des prix accessibles entraînant une utilisation abusive par l'aquaculteur local. En effet, ces pratiques peuvent entraîner la présence de résidus d'antibiotiques et d'hormones dans les parties comestibles du poisson et représenter des risques chimiques avérés pour le consommateur. Selon la directive européenne 96/23/CE (EU, 1996a), on entend par résidu "les résidus de substances ayant une action pharmacologique, leurs produits de transformation, ainsi que d'autres substances se transmettant aux produits animaux et susceptibles de nuire à la santé humaine". Depuis le début des années quatre-vingt, une législation européenne restrictive sur les médicaments vétérinaires s'est mise en place de

INTRODUCTION

manière à limiter autant que possible l'utilisation de substances médicamenteuses pour traiter les animaux destinés à la consommation humaine. Des limites maximales de résidus "LMR" compatibles avec le respect de la santé publique ont été fixées au niveau européen pour toutes les substances actives (Règlement n° 37/2010) (UE, 2010) et devraient être appliquées en Algérie (harmonisation des textes législatifs).

L'antibiothérapie est incriminée dans l'émergence de nouvelles souches bactériennes très résistantes en influençant la flore intestinale et en modifiant sa composition par inhibition sélective de composants déterminés, ou par sélection des micro-organismes résistants (Maghuin-Rogister, 2002). Le secteur aquacole génère une antibiorésistance croisée, ce qui alarme et préoccupe les thérapeutes humains (Rolain, 2013). Les résidus d'antibiotiques peuvent aussi présenter des risques technologiques au niveau de la production alimentaire (Sanz *et al.*, 2010) et avoir un impact polluant sur l'environnement (Armstrong *et al.*, 2005 ; Eurin *et al.*, 2005).

L'eau et l'aliment d'élevage sont considérés comme deux éléments vitaux en aquaculture. L'assurance de leur qualité microbiologique et chimique est cruciale, non seulement pour le bien-être animal (facteurs biotiques et abiotiques assurant de bonnes conditions de survie et de croissance des poissons) mais aussi pour la salubrité des produits finaux (Okonko *et al.*, 2009). La charge microbienne initiale du poisson fraîchement capturé est tributaire de l'habitat habituel où il vit (Al Harbi & Uddin, 2005). L'eau polluée peut aussi renfermer des polluants organiques persistants "POPs" (métaux lourds, hydrocarbures aromatiques polycycliques, dioxines et furanes, PCB...) et d'autres résidus médicamenteux (pesticides, antibiotiques et hormones, etc...) qui peuvent s'accumuler dans les tissus des poissons (Enick & Moore, 2007 ; Cole *et al.*, 2009).

Quant à l'aliment distribué en aquaculture, lorsqu'il est utilisé comme support thérapeutique dans la formulation des aliments médicamenteux, il peut être un vecteur de résidus de médicaments vétérinaires (antibiotiques et hormones) pour l'environnement et pour le poisson (Eurin *et al.*, 2005). D'un autre côté, la nourriture destinée aux poissons peut avoir une incidence potentielle sur la santé humaine à cause des dangers chimiques associés aux additifs, aux contaminants et en particulier certains ingrédients de ces aliments (OMS, 1999). En effet, l'huile de poisson qui est un sous-produit de la production industrielle de la farine de poisson, peut contenir des composés chlorés (insecticides et hydrocarbures). Ces derniers ont un caractère lipophile et s'accumulent chez les poissons capturés dans des eaux polluées. Les mycotoxines sont aussi pointées du doigt. Les céréales qui sont contaminées par des champignons et qui sont incorporés dans l'aliment des poissons, peuvent véhiculer des

INTRODUCTION

mycotoxines (aflatoxines B1, trichothécènes, fumonisines B1 et ochratoxines A) qui peuvent s'accumuler dans leurs tissus (OMS, 1999 ; Pettersson, 2012 ; Selim *et al.*, 2014).

Le poisson a la particularité d'être une denrée alimentaire hautement périssable (Gram & Huss, 1996). Immédiatement après sa mort (*post mortem*), le poisson subit un processus naturel et complexe de décomposition. Il est le résultat de la superposition de réactions chimiques, enzymatiques et bactériennes (Huss, 1995). Ce processus affecte la fraîcheur du poisson et entraîne une rapide altération des propriétés organoleptiques, une réduction de la valeur nutritive et la formation de substances toxiques. La forte teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série des n-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA C20 : 5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA C22 : 6 n-3), rend le poisson très sensible aux réactions d'oxydation (Azhar & Nisa, 2006). Ces dernières limitent sa durée de conservation et conduisent à la formation de produits primaires tels que les diènes conjugués et les hydroperoxydes très instables, qui se décomposent rapidement en produits secondaires hautement réactifs et toxiques tels que les aldéhydes, alcools et cétones. Ces principaux composés sont responsables des mauvaises odeurs (rancissement oxydatif) du poisson altéré (Cillard & Cillard, 2006 ; Rezaei & Hosseini, 2008). L'altération des lipides conduit ainsi à une altération des propriétés technologiques et organoleptiques de la chair du poisson (couleur, odeur, texture), rendant ce dernier impropre à la consommation. De plus, la protéolyse bactérienne et biochimique accentue l'altération du poisson par la formation d'amines volatiles et d'amines biogènes thermostables (Ozogul *et al.*, 2011). L'Azote Basique Volatil Total (ABVT), représente un indicateur remarquable de la qualité du poisson et reflète l'ensemble formé par l'ammoniac et les amines volatiles (triméthylamine, diméthylamine) (Zhou *et al.*, 2011). Dans les conditions d'anaérobiose, des organismes spécifiques d'altération (SSO) utilisent l'oxyde de triméthylamine (TMAO) et produisent des odeurs suite à la formation de triméthylamine (TMA) (Gram & Dalgaard, 2002). Il est connu que les poissons de mer et certains poissons d'eaux douces tel que le tilapia contiennent du TMAO (Niizeki *et al.*, 2003). La température est le facteur environnemental principal qui affecte la croissance et la viabilité des SSO et par conséquent détermine la durée de conservation du poisson (Ozyurt *et al.*, 2009).

L'évaluation des amines biogènes est importante non seulement du point de vue de leur toxicité, mais également parce qu'elles peuvent être le reflet du degré de fraîcheur du poisson (Kantaria & Gokani, 2011). Chez le tilapia, les concentrations de la putrescine et de la cadavérine doivent être prises en considération en raison de leur effet carcinogène

INTRODUCTION

(précurseurs de nitrosamines) et potentialisateur de la toxicité histaminique (AlBulushi *et al.*, 2009; Prester, 2011).

La charge bactérienne en surface (peau et branchies) ou dans les intestins d'un poisson fraîchement capturé est assez importante. Cependant, le système immunitaire maintient le muscle stérile chez le poisson vivant ou frais. Juste après la mort, ce système défensif s'effondre laissant place à l'invasion bactérienne (Leduc, 2011). Les bactéries pathogènes et d'altération envahissent les alvéoles des écailles avant de se proliférer dans les fibres musculaires. Le critère microbiologique de sécurité alimentaire (6 logs cfu g⁻¹) (ICMSF, 1986) peut être rapidement dépassé en fonction de la durée et de la température de conservation.

Compte tenu de la situation réelle de la tilapiculture en Algérie, en particulier au niveau de l'unique ferme aquacole "Fat-Steppes" de l'Ouest algérien, à savoir les défaillances des bonnes pratiques d'hygiène et vétérinaires durant la phase d'élevage, les mauvaises conditions d'entreposages et l'impact climatique (pays tempéré) sur la durée de conservation, l'instauration d'un système d'assurance qualité tout au long de la chaîne de production du tilapia (*O. niloticus*), depuis la production primaire jusqu'au consommateur, s'avère cruciale.

Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif principal, le développement du premier modèle HACCP spécifique à la production du tilapia "*Oreochromis niloticus*" en Algérie. Cette approche scientifique permettra l'évaluation de la gestion de la qualité *ante mortem* et *post mortem* du tilapia produit au niveau de la ferme continentale "Fat-Steppes". Pour ce faire, la démarche classique du système HACCP sera respectée:

- Dans un premier temps, nous tenterons d'évaluer les programmes préalables établis au sein de la ferme "Fat-Steppes" et qui sont basés sur les bonnes pratiques d'hygiène et aquacoles.
- Nous caractériserons le profil nutritionnel de la chair du tilapia "*O. niloticus*", produit localement, par la détermination de sa composition chimique (macronutriments, teneur en eau et en cendres), son profil en acides gras et en acides aminés. Son activité en eau (A_w) et son pH, qui représentent des facteurs intrinsèques influençant la croissance bactérienne (Delhalle *et al.*, 2012), seront également étudiées.
- Par la suite nous analyserons les éventuels dangers, tout au long de la phase d'élevage et la phase de commercialisation et nous déterminerons les différents points critiques de contrôle (PCC) où il est possible de les maîtriser.

INTRODUCTION

- Afin d'apprécier ces dangers et de pouvoir leur fixer des seuils critiques, nous tenterons de développer de nouvelles stratégies analytiques basées sur des techniques de screening (dépistage) et ou de confirmation, compatibles et facilement reproductibles en routine dans les laboratoires algériens.
- Nous mettrons en place des procédures de surveillance, de correction et de vérification permettant la maîtrise des PCC et d'assurer un bon fonctionnement du système HACCP établi.

Durant la phase d'élevage, nous nous focaliserons sur 04 PCC qui sont liés à :

- ✚ la qualité microbiologique et chimique des eaux douces d'élevage,
- ✚ la qualité microbiologique et chimique (résidus d'acide oxolinique et résidus de la 17 α - MT) de l'aliment d'élevage,
- ✚ l'antibiothérapie (acide oxolinique en particulier, antibiotique couramment utilisé dans cette exploitation de tilapiculture contre les bactéries à Gram négatif),
- ✚ l'hormonothérapie avec la 17 α - méthyle testostérone, utilisée pour la masculinisation des juvéniles de tilapia, qui est une technique courante et légale en Algérie.

Durant la phase *post mortem*, nous essayerons d'évaluer l'évolution temporelle de la fraîcheur du tilapia vendu frais, entier et non éviscéré à température ambiante (30°C) ou conservé à 4°C (ces deux températures représentent les deux modes respectifs de commercialisation et de conservation habituels en Algérie). Cette évaluation va nous permettre d'établir une date limite d'utilisation optimale (DLUO) pour la consommation du tilapia frais.

Pour ce faire, différents mécanismes d'altération du poisson liés à la peroxydation lipidique, à la protéolyse enzymatique et bactérienne, à l'altération bactérienne seront investigués et corrélés aux résultats d'une analyse sensorielle.

Les analyses porteront principalement sur les paramètres et les indices de fraîcheur et/ou de qualité suivants :

- ✚ analyse organoleptique : un nouveau Schéma de la Méthode d'Index de Qualité "QIM" sera optimisé pour le tilapia entier non éviscéré,
- ✚ degré d'oxydation des lipides : produits primaires (diènes conjugués et hydroperoxydes) et produits secondaires (TBARS),

INTRODUCTION

- ✚ protéolyse bactérienne et enzymatique : production de six amines biogènes (putrescine, cadavérine, spermidine, spermine, histamine et tyramine) ainsi que l'évolution des taux d'ABVT et du TMA,
- ✚ le pH (facteur biochimique et microbiologique à la fois),
- ✚ la flore mésophile totale et les entérobactéries (test de vieillissement microbiologique).

Comme objectif sous-jacent, nous réaliserons également une synthèse bibliographique des travaux antérieurs pertinents que nous présenterons au sein d'une première partie divisée en quatre chapitres principaux dans lesquels : le tilapia du Nil sera présenté, des notions de qualité et le concept HACCP seront rappelés. La composition et les mécanismes d'altération du poisson seront décrits. Enfin, les intérêts, les mécanismes d'action et l'impact des médicaments vétérinaires (antibiotiques et hormones) utilisés en tilapiculture seront rapportés.

Pour la description des protocoles expérimentaux, la présentation et la discussion des résultats obtenus, nous avons opté pour la structure "IMRAD" qui nous permet de regrouper distinctement les différents chapitres.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

1. Introduction :

Notre modèle d'étude est un poisson d'eau douce, originaire du continent africain. Il a été introduit, durant la deuxième moitié du 20^{ème} siècle dans plusieurs régions du monde : tropicales, subtropicales et tempérées (Lazard, 1990). Son introduction en Algérie est toute récente, les premières expériences d'alevinage ont vu le jour pendant la dernière décennie. Le terme Tilapia est d'origine africaine, il provient du mot "thiape" qui veut dire poisson. Il est aussi utilisé pour désigner un groupe de poisson appartenant à la famille des cichlidés élevé à des fins commerciales. L'élevage des tilapias existe depuis plus de 2500 ans (Chapman, 2003).

Les cichlidés se distinguent des autres familles par des caractères nets : une écaille très développée à l'aisselle des pelviennes, une absence de dents au plafond buccal, des os pharyngiens inférieurs plus ou moins unis sur la ligne médiane. Cette famille appartient à l'ordre des perciformes.

Le genre tilapia englobe quatre espèces différentes de point de vue: caractères anatomiques, comportement reproducteur et mode de nutrition (Trewavas, 1983) :

- ✚ *Oreochromis* : avec une incubation buccale et une garde uniparentale maternelle, ils sont planctonophages;
- ✚ *Sarotherodon*: avec une incubation buccale et une garde biparentale ou paternelle, ils sont planctonophages ;
- ✚ *Tilapia* : avec une incubation des œufs sur substrat et une garde biparentale (en couple), ils sont macrophytophages;
- ✚ *Danakilia*: avec des caractéristiques éco-morphologiques particulières.

En élevage, seul le genre *Oreochromis* est représenté avec cinq espèces principales :

- ✚ *Oreochromis niloticus* (Tilapia du Nil) (Figure 3) ;
- ✚ *Oreochromis mossambicus* ;
- ✚ *Oreochromis aureus* ;
- ✚ *Oreochromis hornorum*;
- ✚ Le Tilapia rouge, issu du croisement : *O. mossambicus* x *O. niloticus*.

Les tilapias sont des poissons rustiques qui présentent une grande prolificité. Ce sont des poissons d'eaux chaudes, douces ou saumâtres. Ils cessent de se reproduire en dessous de 22°C et de se nourrir en dessous de 16°C. Ils sont particulièrement résistants aux conditions anoxiques de l'eau et peuvent survivre avec moins de 1 mg d'oxygène / litre même s'il est

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

souhaitable de rester au-dessus de 3,5 - 4 mg/l. L'aquaculture du tilapia a l'avantage de s'adapter à tous les types de production : étangs, bassins, cages et enclos. Les deux systèmes d'élevage (extensif ou intensif) peuvent facilement être appliqués (Lazard, 1990).



Figure 3 : Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Linnæus, 1766).

2. *Position systématique :*

Règne	Animal
Embranchement	Chordata
Sous-embranchement	Vertebrata
Super-classe	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Sous-classe	Neopterygii
Infra-classe	Teleostei
Super-ordre	Acanthopterygii
Ordre	Perciformes
Sous-ordre	Labroidei
Famille	Cichlidae
Genre	<i>Oreochromis</i>
Espèce	<i>niloticus</i>

II. QUALITE DE LA CHAIR DU POISSON

1. *Généralités :*

Le poisson est un produit carné dont la qualité nutritionnelle est proche de celle de la viande. La chair du poisson contient en moyenne 70 à 80 % d'eau, 16 à 22 % de protéines, et des lipides en quantité très variable allant de 0,5 à 20 % selon les espèces et leur alimentation (Médale, 2005). La chair est très pauvre en glucides, sous forme de glycogène, sa teneur est généralement inférieure à 1 %. La teneur en collagène est faible, habituellement inférieure à 3 % (Regost, 2001). De plus, la chair des poissons se distingue de celle des autres animaux producteurs de viande à la fois par l'organisation structurale des muscles et par ses composants (Médale, 2009).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Structure physique :

La structure et la texture de la chair du poisson diffèrent de celles des autres animaux. La chair est constituée de deux types de muscles :

- Le muscle brun (rouge), de type oxydatif: il caractérise les téléostéens, il est généralement présent sous forme d'une fine couche située sous la peau ; il est plus abondant sur les flancs du poisson (le long de ligne latérale). Sa proportion dans la chair varie d'une espèce à l'autre. Ce muscle participe au déplacement du poisson ce qui explique sa forte vascularisation. Il est considéré comme un muscle de croisière, c'est-à-dire utilisé pour les mouvements continus et lents. Il contient davantage de lipides, de collagène, d'hémoglobine, de glycogène et la majorité des vitamines (Bendiksen & Jobling, 2003 ; Médale, 2009).
- Le muscle blanc, de type glycolytique : quantitativement le plus important puisqu'il représente jusqu'à 50 % de la masse corporelle du poisson et peut constituer jusqu'à 90 % de la masse squelettique (Rome *et al.*, 1988). Il se compose de fibres à contraction rapide et à métabolisme anaérobie de type glycolytique. C'est un muscle de propulsion sollicité lors de la nage intense aux mouvements rapides et soudains (Leduc, 2011).

1.2. Composition chimique :

Il existe une forte disparité dans certains constituants de la chair des poissons en fonction des habitats géographiques et des habitudes alimentaires. Cependant la plupart des espèces de poissons partagent des caractéristiques communes : la chair est particulièrement riche en protéines solubles hautement digestibles de haute valeur biologique dont la teneur est comparable à celle des autres produits carnés. La présence d'acides aminés solubles, une richesse exceptionnelle en acides gras longs polyinsaturés (AGPI) de la série n-3, des minéraux et oligo-éléments particuliers tels que le phosphore, le sélénium, l'iode et le fluor ainsi que des vitamines (Derat-Carrière, 2007). La teneur en protéines de la chair du poisson semble être stable chez toutes les espèces. Elle augmente progressivement lors de la croissance pour se stabiliser à une valeur proche de 20 % (Lefèvre *et al.*, 2008). En revanche, la teneur lipidique et en micronutriments varient considérablement d'une espèce et d'un individu à l'autre en fonction de l'âge, du sexe, de l'environnement, de la saison, de la ponte et est surtout corrélée avec le régime alimentaire (Médale, 2004).

a. **Composés lipidiques**

Les lipides sont présents sous deux formes dans les muscles des poissons :

- Lipides polaires ou phospholipides (lipides de structure) : ce sont les composants majeurs des membranes cellulaires, leur teneur et leur composition sont relativement constantes.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les phospholipides sont principalement composés de phosphatidylcholine (50 à 60 % des phospholipides) et de phosphatidyléthanolamine (20 à 30 % des phospholipides) (Aursand *et al.*, 1994). Ils se caractérisent par une grande richesse (jusqu'à 60 %) en acide gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne. Les phospholipides sont connus pour leur rôle dans le maintien de la fluidité membranaire, même à basse température. Ils peuvent aussi être un bon apport en acides gras essentiels pour l'alimentation des larves dans les élevages aquacoles (Cahu *et al.*, 2003).

Les lipides de structure contiennent également du cholestérol, principalement sous forme de stérides (cholestérol estérifié) (20 à 80 mg/100 g dans la chair des différentes espèces de poissons) (Médale, 2008). Le cholestérol contribue à la stabilité et au maintien des structures des membranes cellulaires en s'intercalant entre les phospholipides (formant la bicouche de la membrane) (Mesmin, 2007).

- Lipides neutres ou lipides de réserves : ils sont constitués essentiellement par des triglycérides eux aussi caractérisés par une proportion élevée d'AGPI de la série n-3. La teneur en triglycérides est extrêmement variable en fonction de l'espèce, de l'âge, de la taille des poissons, de leur état de maturité sexuelle et du contenu énergétique de leur alimentation (Médale, 2008).

Les réserves énergétiques du poisson se font principalement sous la forme de triglycérides. Le stockage des lipides peut se faire dans plusieurs tissus: foie, muscle, tissu adipeux péri-viscéral et parfois tissu adipeux sous-cutané (Médale, 2009). L'importance de ces sites de stockage varie selon les espèces. D'une manière globale, les viscères et le foie sont les lieux de stockage principaux pour les espèces maigres (Sheridan, 1988), alors que c'est principalement le muscle et certaines parties sous la peau pour les espèces grasses (Corraze & Kaushik, 1999). En fonction de la capacité du tissu musculaire à stocker les lipides, les poissons peuvent être répartis en trois groupes (Médale, 2009):

- poissons maigres : dont la teneur en lipides dans le muscle est inférieure à 1 %. Ces derniers sont massivement déposés dans le foie (jusqu'à 70 %). C'est le cas des poissons de fond comme la sole (*Solea solea*).

- poissons gras : dont la teneur en lipides dans le muscle est supérieure à 5 %. C'est le cas des espèces pélagiques comme le hareng (*Clupea harengus*) et le maquereau (*Scomber japonicus*).

- poissons "intermédiaires" ou semi-gras : dont la teneur en lipides est comprise entre 1 % et 5 %. Ces poissons cumulent les lipides dans le tissu adipeux péri-viscéral et ensuite dans le muscle comme les salmonidés.

Les lipides présents dans les organismes aquatiques sont caractérisés par leur richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI) appartenant principalement à la série des n-3 à longue chaîne. Médale, en 2008, a rapporté que l'EPA et le DHA, représentent en moyenne 25 % des lipides de la chair des poissons carnivores contre seulement 0,5 à 3 % chez les animaux terrestres. Les n-3 confèrent à la chair du poisson sa valeur diététique (Connor, 2000) puisqu'ils sont reconnus comme des aliments fonctionnels, incontestablement bénéfiques contre les maladies cardio-vasculaires (Lecerf, 2007), les phénomènes inflammatoires (Calder *et al.*, 2011), le déclin cognitif (Bourre, 2005) et le développement optimal du système nerveux central (Guesnet *et al.*, 2005). Cet apport en AGPI est sous la dépendance quasi exclusive de l'alimentation. Provenant de la chaîne trophique aquatique en milieu naturel et sous forme d'huile de poisson incorporé dans l'alimentation en élevage (De Souza *et al.*, 2007).

b. Composés protéiques

Les protéines sont les constituants organiques majeurs des tissus de poissons. La teneur en protéines des tissus musculaires semble être remarquablement constante chez les poissons avec une valeur moyenne de 18,5 % (Médale, 2004). Les protéines des tissus musculaires du poisson peuvent être divisées en trois groupes (Leduc, 2011):

- Les protéines structurales (protéines myofibrillaires) telles que l'actine, la myosine, les tropomyosines, les troponines, la desmine, la titine, la nébuline, l' α -actinine, qui constituent 70 à 80 % des protéines totales.
- Les protéines sarcoplasmiques (myoglobine, globuline et enzymes) représentent 10 à 30 % des protéines totales.
- Les protéines du tissu conjonctif (protéines insolubles) constituent environ 3 % des protéines chez les téléostéens et environ 10 % chez les élasmobranches (comparé à 17 % chez les mammifères). La teneur en collagène qui est le constituant majeur du tissu conjonctif est jusqu'à 10 fois plus faible que dans la viande de bœuf. Le collagène de la chair de poisson contient 2 à 3 fois moins d'hydroxyproline, acide aminé jouant un rôle déterminant dans la résistance mécanique du tissu conjonctif, ce qui participe aux différences de texture entre le poisson et les viandes (Médale *et al.*, 2008).

Le profil des acides aminés de la chair de poissons est semblable à celui des mammifères. Il est étroitement corrélé à celui de l'aliment (Gomez-Requeni *et al.*, 2004). Les acides aminés libres proviennent de la digestion des protéines alimentaires et de l'hydrolyse des protéines corporelles. La teneur en acides aminés libres du muscle du poisson varie de 0,5 à 2 % de la matière fraîche selon les espèces (Haard, 1992). Le poisson représente une importante source en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) qui peuvent substituer et améliorer de façon

significative la valeur biologique des régimes humains basés essentiellement sur les céréales (Huss, 1995). Les acides aminés jouent aussi un rôle important dans la régulation de la pression osmotique (Huss, 1995).

c. **La Fraction Azotée Non Protéique**

Huss (1995) a décrit les extraits azotés comme étant des composés de nature non protéique, solubles dans l'eau, de faibles poids moléculaires et renfermant de l'azote. Cette fraction ANP (Azote non protéique) constitue de 9 à 18 % de l'azote chez les téléostéens. Elle se compose principalement : des bases volatiles telles que l'ammoniaque et l'oxyde de triméthylamine (OTMA), des acides aminés libres, des bases nucléotides et des bases puriques. Dans le cas des poissons cartilagineux, la fraction ANP comprend aussi l'urée. Quantitativement, la créatine représente la principale composante de cette fraction. Elle fournit de l'énergie pour la contraction musculaire. Les acides aminés libres contenant l'imidazole semblent prédominer chez la plupart des poissons et composent de façon importante la fraction ANP. Les plus recensés d'entre eux sont : la taurine, l'alanine, la glycine et en particulier l'histidine. Oehlenschläger & Rehbein (2009) ont démontré l'existence de différences de la composition en ANP selon les espèces et entre individus de la même espèce.

d. **Vitamines et sels minéraux**

Les poissons sont riches en vitamines liposolubles A et D et en vitamine hydrosoluble B (Médale 2010). Ils constituent une bonne source de minéraux comme le calcium, l'iode, le fer, le phosphore et le potassium. Comme éléments traces abondants dans le poisson, on peut mentionner le cobalt, le cuivre, le manganèse, le molybdène, le sélénium et le zinc (Leduc, 2011).

2. **Altération du poisson :**

Le poisson est une denrée alimentaire fragile et hautement périssable (Dalgaard, 1995). Son altération est un phénomène séquentiel qui commence immédiatement après la mort du poisson (*post mortem*). La décomposition débute par une autolyse enzymatique suivie d'une dégradation bactérienne (Adolphe, 2006). Ce processus conduit à des changements irréversibles et à une qualité indésirable. La fraîcheur et les propriétés organoleptiques sont altérées, la valeur nutritive est réduite et des substances toxiques sont formées.

2.1. Altération organoleptique

Les changements sensoriels du poisson sont perçus par les sens humains (vue, odorat, goût et toucher). L'apparence, l'odeur, la texture et le goût étant les quatre paramètres organoleptiques classiques à évaluer. Les premières modifications sensorielles du poisson pendant le stockage

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

concernent l'apparence et la texture. Le goût et l'odeur évoluent ultérieurement. Le changement le plus important est l'établissement de la *rigor mortis*. Ce phénomène n'est pas encore totalement élucidé (Huss, 1995). Chéret (2005) a rapporté que lorsque le poisson est mort, la circulation du sang s'arrête, l'approvisionnement en oxygène est stoppé et l'énergie (ATP) est interrompue. En conséquent, l'énergie est produite à partir de la décomposition du glycogène. Sa teneur étant très faible, elle s'épuise rapidement et l'ATP produit se retrouve à son niveau minimal (1,0 mmole/g). La contraction musculaire en soi est contrôlée par le calcium et une enzyme l'ATP-ase que l'on trouve dans chaque cellule musculaire. Quand les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} sont $> 1 \text{ mM}$, l'ATP-ase activée par le Ca^{2+} réduit la quantité de l'ATP musculaire libre, ce qui conduit à l'interaction entre les principales protéines contractiles, l'actine et la myosine (Leduc, 2011). Ces derniers se relient entre eux de façon irréversible et provoquent la raideur musculaire. Généralement, le muscle est totalement détendu et la texture élastique et souple. Cet état dure habituellement quelques heures, après quoi le muscle se contracte. Quand il durcit, le corps se raidit et le poisson est alors en état de *rigor mortis*. Cet état dure habituellement un jour ou plus et alors la *rigor* disparaît, ce qui détend le muscle à nouveau et le rend souple mais n'est plus aussi élastique qu'avant l'état de la *rigor*. Le rapport entre l'apparition et la disparition de la *rigor* varie d'une espèce à l'autre et est affecté par la température, la manutention, la taille, le stress du poisson et le mode d'abattage (Huss, 1995). La disparition de la *rigor* est un processus qui n'a pas encore été entièrement élucidé mais qui produit toujours le ramollissement du tissu musculaire. Ce phénomène serait en partie expliqué par l'activation d'enzymes protéolytiques naturelles du muscle qui digèrent certains composants du complexe de *rigor mortis* (Leduc, 2011). Parmi ces protéases, des cathepsines (D et L), des calpaines et des collagénases ont été souvent incriminés dans la dégradation autolytique *post mortem* de la chair du poisson (Chéret, 2005).

Jarding *et al.* (2000) ont démontré que le tilapia (*Oreochromis niloticus*) rentre rapidement en rigidité cadavérique. Son apparition a été plus rapide chez les tilapias stockés sous la glace que pour ceux conservés à température ambiante ($20 \pm 3^\circ\text{C}$). La taille du poisson influence la rigidité cadavérique. Elle apparait rapidement chez les poissons de petite taille (Huss, 1995). Le processus de la *rigor mortis* peut conduire à des défauts de qualité dans la chair des poissons (filets de poissons) tels que le ramollissement de la chair, la présence de taches de sang, les déchirures, la perte de la capacité de rétention d'eau (Bremner, 2002) ainsi que la réduction du rendement de filetage (Huss, 1995).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'analyse sensorielle est objectivement et systématiquement utilisée dans l'inspection du poisson. Elle a l'avantage d'être rapide et permet la mesure de plusieurs caractéristiques à la fois. Elle est précise lorsqu'elle est réalisée par des opérateurs spécialisés et formés. Le système de cotation européen régi par le règlement (CE) N°2406/96 (EU, 1996) a longtemps été utilisé comme référence fixant les normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche (poissons, crustacés et céphalopodes). Les produits de la pêche susceptibles d'être commercialisés sont classés selon leurs niveaux d'altération dans l'ordre décroissant (du plus frais au moindre) : Extra (E), A, B et C (non consommable) sur la base d'un ensemble de critères organoleptiques (apparence, odeur, yeux, branchies et cavité abdominale). Cette méthode européenne a été critiquée par les scientifiques en raison de la complexité du schéma de cotation, la nécessité d'avoir un staff qualifié pour réaliser l'analyse organoleptique et les résultats qui ne sont pas toujours concluants. Comme alternative à ce schéma européen, la méthode d'index qualité (QIM) a été suggérée. Elle est originaire d'Australie (Bremner *et al.*, 1985) et elle est basée sur les changements des caractéristiques sensorielles des poissons crus et entiers lors de leur altération. Des notes de 0 à 1 ; 0 à 2 ; ou 0 à 3 points de démerite (ou index) sont attribuées en fonction des changements se produisant au niveau de l'odeur, de la texture, de l'aspect des yeux, de la peau et des branchies. Les points ainsi attribués sont additionnés pour donner une note sensorielle globale (score de démerite) ou QI (Quality Index). La relation entre les scores sensoriels et la durée de conservation sous glace (0°C) est linéaire permettant la prévision de la durée possible de conservation avec une précision satisfaisante (Huss, 1995). La Figure 4 illustre une cinétique typique de cette relation linéaire.

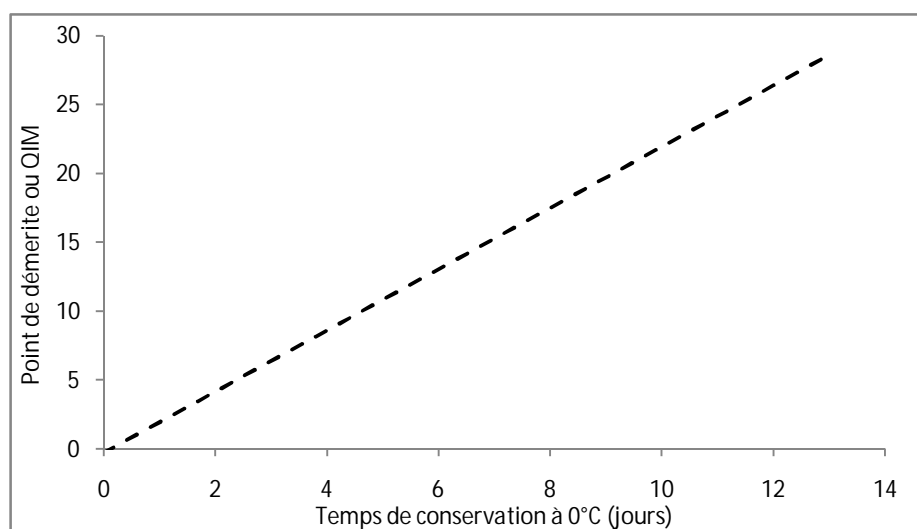


Figure 4 : Evolution typique des scores sensoriels selon la méthode QIM (Odoli, 2009).

De nombreuses tables de cotation QIM ont été développées pour différentes espèces de poisson. Des logiciels informatiques ont été développés afin de faciliter l'application des cotations QIM tels que "QIM Rating System et Wise-Fresh ". De plus, de nouveaux schémas spécifiques aux filets de poisson ont été établis (Bonilla, 2004 ; Odoli, 2009).

2.2. Altération biochimique

2.2.1. **Autolyse et catabolisme de nucléotide**

Juste après la mort du poisson, la dégradation des composés reliés à l'ATP est parmi l'une des premières autolyses actives. L'ATP est rapidement dégradée pour former l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate (AMP), l'inosine-monophosphate (IMP), l'inosine (Ino) et l'hypoxanthine (Hx). Le taux de dégradation de l'ATP est exprimé par le facteur K, calculé selon la formule suivante (Saito, 1959) :

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

Dans le poisson frais, le facteur K est faible; il constitue un indicateur de fraîcheur fiable des produits de la pêche réfrigérés, fumé ou entreposé sous atmosphères modifiées. Le facteur K dépend de diverses variables: l'espèce de poisson, la méthode d'abattage, les conditions et durée/température de l'entreposage et des manipulations (Huss, 1995).

2.2.2. **Oxydation des lipides**

a. La lipolyse :

La stabilité des lipides vis-à-vis de l'oxydation dépend de leur localisation dans les différents tissus (Eymard, 2003). Les lipides du muscle de poissons sont enclins à la peroxydation en raison de leur importante teneur en AGPI (Yarnpakdee *et al.*, 2012).

La lipolyse est l'un des principaux mécanismes de dégradation *post mortem* des lipides qui permet la libération des A.G.P.I. (Eymard, 2003). C'est un phénomène enzymatique qui se déroule dans la chair crue au cours de sa maturation ou conservation. Elle n'est pas observée dans la viande cuite car la cuisson dénature les enzymes lipolytiques. La lipolyse est catalysée par des enzymes spécifiques : les lipases et les phospholipases (Van Der Bosch, 1980) qui présentent un pH d'activité optimale basique (Alanasier, 1996). Chez les poissons, il s'agit de la phospholipase C (PLC) et de la phospholipase A2 (PLA2). Les phospholipases A1 et D étant des voies mineures (Bacot, 2004). Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters des glycérides et libèrent à partir des triglycérides (T.G.) des acides gras libres (A.G.L.), des monoglycérides (M.G.) et des diglycérides (D.G.) (Eymard, 2003). L'activité lipolytique, bien que faible, persiste lors de la conservation à l'état congelé. Ces réactions de lipolyse induisent une

dégradation du produit. De plus, les acides gras libérés interagissent avec les protéines favorisant leur dénaturation et conduisant à l'altération du poisson (Azhar & Nisa, 2006).

b. La peroxydation lipidique

Dans les conditions normales (poissons vivants), la peroxydation lipidique existe. C'est un processus physiologique naturel et continu d'ordre enzymatique, indispensable à la synthèse des prostaglandines et leucotriènes, à la leucocytose, à la phagocytose et aux remaniements des membranes cellulaires (Marcel, 2002). En condition *post mortem*, on parle de peroxydation lipidique non enzymatique ou spontanée. C'est un processus oxydatif d'altération des lipides portant essentiellement sur les AGPI. En effet, il est établi que les AGPI sont des cibles privilégiées en raison de leurs doubles liaisons bis-allyliques facilement oxydables (Servais, 2004). De plus, les acides gras saturés (AGS) ne s'oxydent qu'à des températures supérieures à 60°C, tandis que les acides gras polyinsaturés s'oxydent même lors de l'entreposage des poissons à l'état congelé (Favier 2003). Par ailleurs, les triglycérides sont peu réactifs parce qu'ils contiennent des acides gras à courte chaîne (2 ou 3 doubles liaisons). Ils sont regroupés dans des gouttelettes, ils n'ont que peu de contact avec les catalyseurs de l'oxydation qui sont localisés dans la phase aqueuse des cellules adipeuses et musculaires.

En fonction de l'agent initiateur, on classe l'oxydation des lipides en 3 types :

- l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libre ;
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photo-sensibilisateurs ;
- l'oxydation enzymatique initiée par la présence des enzymes d'oxydation.

Lorsque le tissu est vivant, il existe des mécanismes naturels de contrôle qui permettent de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques. Le dérèglement intervient lors de la destruction du tissu (Hultin, 1994), notamment lors de la dégradation des membranes (Huang *et al.*, 1993).

L'oxydation des lipides est conditionnée par différents facteurs, à savoir, la composition en acides gras, le nombre et la position des insaturations, la présence de pro-oxydant (ions métalliques et enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc...), la surface exposée à l'oxygène, la température, la lumière, etc...

L'oxydation des lipides peut résulter de causes multiples. Ainsi l'auto-oxydation est catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres. La photo-oxydation est initiée par la lumière en présence de photo-sensibilisateurs. L'oxydation enzymatique est initiée par la lipoxygénase. Il s'agit dans tous les cas d'une réaction auto-catalytique, par enchainement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (Figure 5). Au cours de la première étape

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

"amorçage ou initiation", un atome d'hydrogène est arraché à un acide gras insaturé. Très rapidement une molécule d'oxygène se fixe sur ce radical lipidique. Le radical peroxyde ainsi formé est très réactif. Il arrache un atome d'hydrogène à un autre acide gras pour former un hydroperoxyde, propageant ainsi la réaction. Les hydroperoxydes sont des molécules intermédiaires importantes qui peuvent refléter l'état oxydatif d'un aliment par de simples méthodes de dosage (Al-Sayed, 2007). Cependant, ce sont des composés instables, sans odeur particulière, qui se dissocient, en particulier en présence d'ions métalliques, par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyl et un radical hydroxyle (radicaux libres) qui interviennent dans une série de réactions complexes aboutissant notamment à la formation de composés secondaires. Ces derniers sont constitués de dizaines de molécules volatiles de faible poids moléculaire et de molécules non volatiles. Certaines molécules volatiles possèdent une odeur propre et peuvent être réactives (aldéhydes), et donc susceptibles de réagir avec d'autres constituants tel que les protéines. Des produits de fin de réaction, de structures et de propriétés diverses, sont ainsi formés. Il s'agit de la terminaison de la réaction.

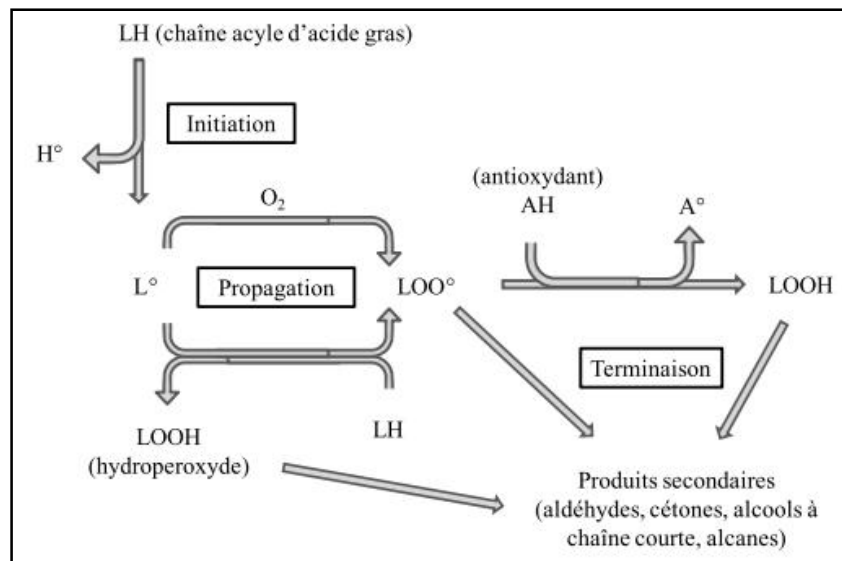


Figure 5 : Auto-oxydation des lipides polyinsaturés (AL-Sayed, 2007).

L^\bullet : Radical libre de lipide, AH : Antioxydant, A^\bullet : Radical libre.

La cinétique de l'oxydation peut être illustrée selon le schéma repris dans la Figure 6. Lors du déroulement de l'oxydation, vont apparaître et disparaître successivement les produits primaires et secondaires de l'oxydation.

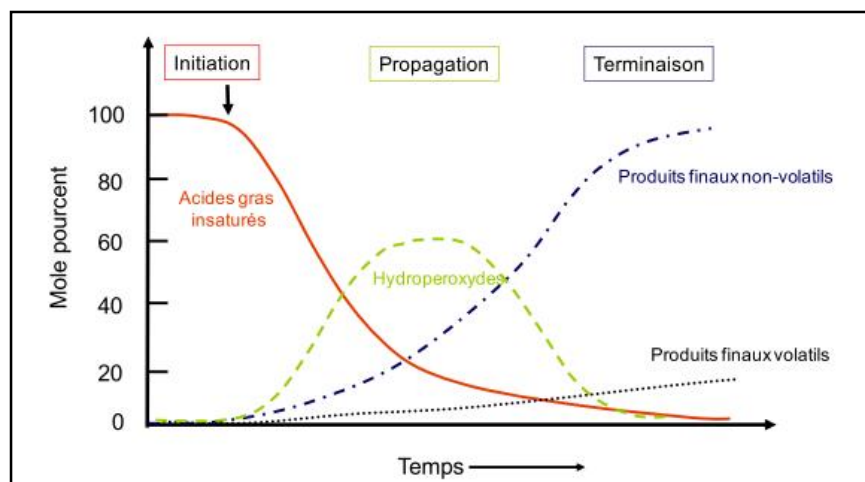


Figure 6 : Cinétique d'oxydation des acides gras insaturés (Gardner, 1987).

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut également être d'origine enzymatique. La lipoxygénase et la cyclo-oxygénase sont les deux enzymes principales impliquées (Hultin, 1994). Les substrats privilégiés de la lipoxygénase du poisson sont les acides gras polyinsaturés (Josephson & Lindsay, 1986a). L'oxydation se produit même aux températures les plus basses. En effet, à l'état congelé cette activité est très faible. Une fois la décongélation amorcée et à des températures variant entre 0°C et 4°C, cette activité reprend et s'accroît (Frankel, 1998). A des températures supérieures à 60°C, contrairement aux lipoxygénases du poisson qui sont inactivées, l'oxydation non enzymatique sera favorisée.

2.2.3. Composés volatils

L'odeur du poisson représente un important paramètre de fraîcheur. Le poisson frais contient peu de composés volatils et est pratiquement inodore. Peu, après la pêche, des odeurs plaisantes caractéristiques du poisson frais évoluent en raison de l'activation des lipoxygénases sur la peau et les branchies des poissons marins et d'eaux douces (German *et al.*, 1985). Progressivement, cette activité enzymatique sur les acides gras polyinsaturés génère des composés carbonylés à longues chaînes et des alcools responsables des odeurs modérées caractéristiques de plante, de melon et de champignon (Josephson & Lindsay, 1986b). Quand l'accumulation de ces deux derniers composés volatils atteint un niveau élevé en raison d'auto-oxydation, ils contribuent à l'odeur oxydée (rance) (Josephson, 1991). D'autres composés volatils dérivant des altérations biochimiques peuvent aussi influencer les odeurs des poissons tels que les composés soufrés volatils, les aldéhydes, les cétones, les esters, et d'autres composés de faible poids moléculaire. Différents substrats sont mobilisés pour la production des composés volatils : les glucides

(par exemple lactate et ribose), les nucléotides (par exemple inosine monophosphate et inosine) et d'autres molécules azotées non protéiques (ANP). Les acides aminés sont particulièrement importants pour la formation des sulfures et de l'ammoniaque (Leduc, 2011). La plupart des composés volatils sont produits par les bactéries (Shewan, 1962). Les plus marquants sont la triméthylamine (TMA), les composés soufrés et des acides volatils (produits lors de la dégradation bactérienne des acides aminés tels que l'acide acétique et l'acide propanoïque) (Aro *et al.*, 2002).

Le contrôle de quelques composés volatils peut être réalisé par une méthode basique et simple qui est la détermination de l'azote basique volatil total (ABVT) par distillation à la vapeur (Règlement CE/2074/2005) (EU, 2005b). Ce dernier reflète l'ensemble formé par la triméthylamine, l'ammoniac (NH₃, produit par désamination des acides aminés et des catabolites de nucléotides), la diméthylamine (DMA, produit à partir de l'oxyde de triméthylamine "OTMA" par les enzymes autolytiques durant la congélation) et d'autres amines volatiles (Leduc *et al.*, 2011). D'autres méthodes plus performantes peuvent être utilisées pour la détection des composés volatils. Les nez électroniques sont des systèmes de multicapteurs permettant de détecter les substances volatiles. Les résultats obtenus sont très dépendants de la base de données existante et des capteurs. Il s'agit d'une méthode physique rapide avec un appareillage relativement petit et transportable (El Barbri *et al.*, 2007). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et l'olfactométrie est une méthode révolutionnaire pouvant détecter plusieurs composés volatils simultanément (Leduc *et al.*, 2011).

2.2.4. Amines biogènes

Les amines biogènes (ABs) sont des composés azotés basiques non volatils de faible poids moléculaire. Elles peuvent être classées selon leurs structures chimiques en : amines aliphatiques (putrescine, cadavérine, spermine, spermidine), aromatiques (tyramine, phényléthylamine) ou hétérocycliques (histamine, tryptamine). Elles peuvent aussi être divisées en monoamine (tyramine), diamines (histamine, putrescine et cadavérine) ou polyamines (spermine et spermidine) en fonction du nombre de groupes amines. Les ABs peuvent se former par amination et transamination d'aldéhydes et de cétones (Zaman *et al.*, 2009) ou principalement par décarboxylation d'acides aminés libres (Onal, 2007 ; EFSA, 2011 ; Prester, 2011). Les ABs sont naturellement formées et dégradées par le métabolisme des animaux, des plantes et des micro-organismes. Cependant, leur formation n'est possible que lorsque trois conditions sont réunies : disponibilité d'acides aminés libres, présence des micro-organismes

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

avec la voie catabolique appropriée et présence d'un environnement favorable à l'activité de décarboxylation (Kantaria & Gokani, 2011).

Des *Enterobacteriaceae* appartenant aux genres *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* et *Shigella* sont associées à la production de quantités considérables de putrescine, de cadavérine et d'histamine dans les produits de la pêche et les viandes (Russo *et al.*, 2010). Des *Vibrionaceae*, des bactéries lactiques, des espèces de *pseudomonas* et des *clostridies* peuvent aussi être impliqués (Duflot, 2009).

En général, le nom de l'amine biogène correspond au nom de l'acide aminé dont il dérive; ainsi, l'histamine, la tyramine et la cadavérine sont formées à partir de l'histidine, la tyrosine et la lysine, respectivement. La putrescine est constituée selon deux voies différentes : par la décarboxylation de l'ornithine ou l'arginine et la désamination subséquente du produit. Les amines biogènes sont biologiquement actives, elles sont impliquées de façon spécifique dans certaines activités cérébrales humaines, elles régulent la température corporelle, le pH stomacal, la sécrétion acide gastrique, les réactions immunitaires, la croissance et la différenciation cellulaire (Prester, 2011).

Chez une personne saine, les amines biogènes d'origine alimentaire sont rapidement métabolisées par des enzymes spécifiques : mono et diamino-oxidases (MAO et DAO) ainsi que l'histamine N-méthyle transférase (HNMT), polyamine transférase (PAO) et spermidine/spermine acétyl-transférase (Prester, 2011). Néanmoins, une prise orale excessive d'amines biogènes peut induire des réactions défavorables. L'histamine et la tyramine peuvent causer des problèmes de santé vasoactifs et psychoactifs, incluant des nausées, des maux de tête, des éruptions cutanées, hyper ou hypotension et des allergies (Hungerford, 2010). Ces réactions sont plus marquées chez les individus sensibles et ceux dont le système de détoxification d'amines biogènes (MAO et DAO) est altéré (Karovicova & Kohajdova, 2005). Cette détoxification (Figure 7) peut être perturbée par l'augmentation de la perméabilité digestive secondaire à la prise d'alcool, d'épices ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, ainsi que lors de désordres génétiques (Prester, 2011) ou de prise de médicaments à effet inhibiteur des MAO et DAO (antihistaminiques, antibiotiques, curares, agents antimalaria, etc...) qui peuvent affecter cette détoxification (Beaudouin *et al.*, 2009). D'autres amines biogènes telles que la putrescine, la cadavérine et la tyramine sont susceptibles de potentialiser l'effet histaminique en inhibant les enzymes catabolisant l'histamine dans l'intestin (DAO, MAO et HNMT) (Karovicova & Kohajdova, 2005 ; Duflot, 2009).

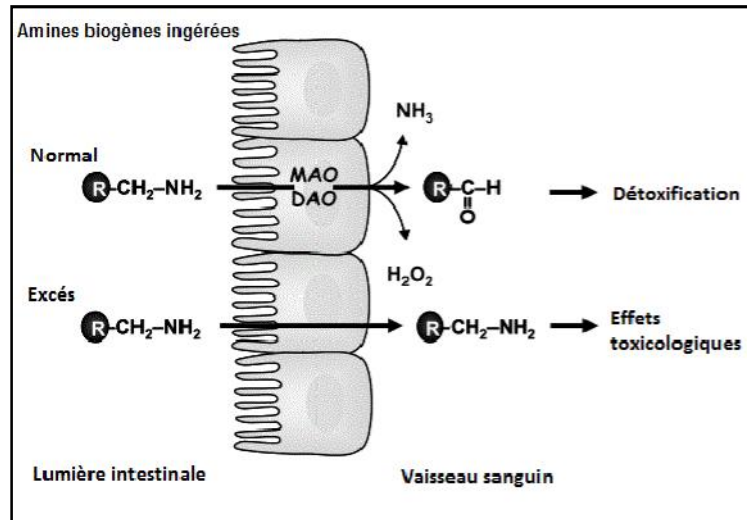


Figure 7 : Devenir des amines biogènes dans le tractus intestinal humain (Kantaria & Gokani, 2011).

En outre, Prester (2011) a rapporté que des amines biogènes soumises à la chaleur peuvent générer des nitrosamines carcinogènes. En effet, la putrescine et la cadavérine, qui sont généralement accumulées dans les poissons décomposés, peuvent générer des amines nitrosables respectives du genre pyrrolidine et piperidine qui en réagissant avec les nitrites génèrent des *N*-nitroso-composés du genre : Nitrosopyrrolidine (NPYR) et Nitrosopiperidine (NPIP) respectivement (Figure 8). De plus, la tyramine est convertie en un composé mutagène, le 3-diazotyramine (3-DT) (après traitement avec des nitrites dans des conditions acides) (Figure 8). Les *N*-nitroso-composés ne sont pas détectables dans les produits de la pêche frais. Par contre, dans les produits de la pêche traités ou transformés (salés, frits, marinés ou fumés), la formation de nitrosamines est considérable, et peut même dépasser le seuil limite de tolérance de 3 µg/kg (Yurchenko & Molder, 2006 ; AlBulushi *et al.*, 2009).

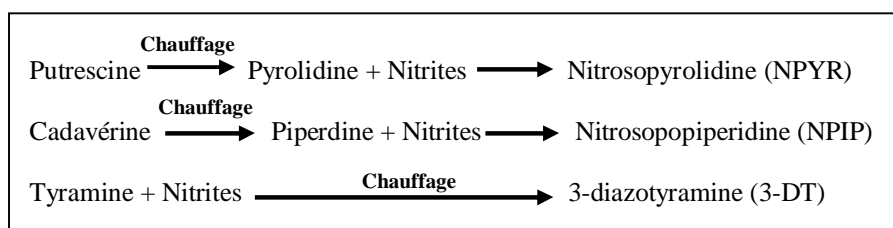


Figure 8 : Nitrosation des amines du poisson (Prester, 2011).

Le dépistage précoce des bactéries productrices d'amines biogènes et le contrôle des amines biogènes dans le poisson est devenu crucial, en raison de (Önal, 2007):

- la toxicité potentielle des ABs qui affecte la sécurité alimentaire;
- la possibilité d'employer les ABs en tant qu'indicateur de qualité des aliments.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

De ce fait, les ABs font partie des risques chimiques à maîtriser lors de l'instauration d'un système HACCP dans les ports de pêche, les fermes aquacoles et les entreprises de transformation. Idéalement, six amines biogènes (histamine, putrescine, cadavérine, tyramine, spermidine et spermine) sont investiguées. L'histamine est le marqueur principal pour l'évaluation de la qualité et de la sûreté des poissons bleus. En revanche, la putrescine et la cadavérine sont des indicateurs fiables de la décomposition des poissons blancs.

Chez les poissons appartenant aux familles des *Scombridés* et des *Clupéidés*, les taux d'histidine libre sont importants. Ceci implique un risque d'intoxication histaminique et éventuellement des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (Duflot, 2009, Hungerford, 2010). Un index de qualité (IQ) et un index d'amines biogéniques (IAB) ont été établis par Mietz & Karmas (1977) et Veciana-Nogues *et al.* (1997) selon les formules respectives suivantes :

- ◆ $IQ = (\text{histamine} + \text{putrescine} + \text{cadavérine}) / (1 + \text{spermidine} + \text{spermine})$.
- ◆ $IAB = \text{histamine} + \text{putrescine} + \text{cadavérine} + \text{tyramine}$.

Des valeurs seuils reflétant la fraîcheur du poisson ont été fixées pour les deux indices (IQ & IAB) à 10 mg kg^{-1} et 20 mg kg^{-1} respectivement (Mietz & Karmas, 1977 ; Veciana-Nogues *et al.*, 1997).

Afin de mettre en évidence la présence des amines biogènes, une panoplie de méthodes est disponible pour leur screening et/ou quantification. Pour les analyses de routine, des techniques rapides ne nécessitant pas d'équipement lourd, ont été développées.

Une méthode de séparation est souvent décrite pour le screening ou la semi-quantification des ABs grâce à la chromatographie sur couche mince (CCM) simple ou de haute performance (HPTLC) (Shakila & Vasundhara, 2002 ; Lapa-Guimaraes & Pickova, 2004 ; Latorre-Moratalla *et al.*, 2009 ; Tao *et al.*, 2011).

Des méthodes enzymatiques ou immuno-enzymatiques sous forme de kits sont commercialisées pour le dosage de l'histamine en particulier. Des milieux de culture différentiels contenant un indicateur de pH (Moeller, 1954 ; Niven *et al.*, 1981 ; Bover-Cid & Holzapfel, 1999) sont développés.

Par contre, la méthode de séparation HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) est retenue comme méthode de référence par le règlement européen n° 2073/2005 (EU, 2005a) ainsi qu'aux Etats-Unis et pour le Codex Alimentarius (méthode AOAC 977.13). Cette technique HPLC ou UPLC (Ultra performance liquide chromatographie) peut être couplée à une détection UV (Anderson, 2008 ; Dadakova *et al.*, 2009), fluorescence (De La Torre & Conte-Junior, 2013) ou spectrométrie de masse (Garcia-Villar *et al.*, 2009 ;

Jia *et al.*, 2012).

D'autres méthodes d'analyse encore plus performantes ont été décrites par Onal (2007) telles que : l'électrophorèse capillaire (Frazier, 2001), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou encore l'analyse par injection en flux continu (FIA). Plus récemment, des méthodes moléculaires (PCR) ont été développées pour la détection et la quantification des gènes codant pour des décarboxylases microbiennes responsables de la production d'ABs (Marcobal *et al.*, 2006 ; Landete *et al.*, 2007 ; Ladero *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2012).

Sur le plan réglementaire, seule l'histamine est régie par différents textes :

- Règlement de la commission européenne (2073/2005/CE) (EU, 2005a): afin de déterminer la teneur d'histamine (scombrottoxine), 9 échantillons ($n = 9$) de poissons sont analysés.

- Deux échantillons peuvent dépasser 100 mg.kg^{-1} sans atteindre 200 mg.kg^{-1} .
- Aucun échantillon ne doit dépasser 200 mg.kg^{-1} .

Ces limites s'appliquent seulement aux poissons des familles suivantes :

Scombridés : (maquereaux, auxides, thonites, thons, thazards, palomettes, bonites) ;

Clupeidés : (harengs, menhadens, chardins, sardines, sardinelles, sardinops, sprats, ... ;

Engraulidés : (anchois) ;

Coryphaenidés : coryphènes commune (mahi- mahi),

- Codex Alimentarius:

- Seuil de qualité, indicateur de qualité du poisson = 100 mg.kg^{-1} .
- Seuil de santé publique = 200 mg.kg^{-1} .

- USFDA (The United States Food and Drug Administration) (AOAC, 2002): 50 mg.kg^{-1} .

- Règlement algérien (J.O n° 58 /2006) (JORADP, 2006): 100 mg.kg^{-1} .

2.3. Qualité microbiologique

Initialement, des micro-organismes sont présents sur toutes les surfaces externes (peau et branchies) et dans les intestins du poisson vivant ou fraîchement capturé. La charge microbienne, très variable, est de l'ordre de 10^2 à 10^7 ufc.cm⁻² de peau et de 10^3 à 10^9 ufc.g⁻¹ de branchies ou d'intestins (Shewan, 1962). Cette grande variabilité reflète l'environnement et l'alimentation des poissons (Liston, 1980). La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché, est stérile car le système immunitaire du poisson empêche les bactéries de se multiplier et de proliférer dans la chair. A la mort du poisson, le système immunitaire s'effondre et les bactéries peuvent proliférer librement. La pénétration des bactéries s'effectue en partie par la peau, mais pour l'essentiel par le système vasculaire à partir des branchies et de la cavité

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

abdominale. Les bactéries de l'intestin peuvent par ailleurs investir directement les muscles de la paroi abdominale, la pénétration est facilitée par l'action des enzymes digestives. A la surface de la peau, les bactéries colonisent largement les alvéoles des écailles. Pendant le stockage, elles envahissent la chair en se déplaçant entre les fibres musculaires. On doit faire la distinction entre les termes : flore d'altération et bactéries d'altération. La première décrit simplement les bactéries présentes sur le poisson quand il s'altère (ex. *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* et *Acinetobacter*) tandis que la seconde constitue le groupe spécifique qui produit les odeurs et les goûts désagréables associés à la dégradation (ex. *Shewanella spp*, *Pseudomonas spp* et *Photobacterium phosphoreum*) (Tableau III). Une grande partie des bactéries présentes sur le poisson altéré ne joue aucun rôle dans son altération (Huss, 1994).

Tableau III : Microflore dominante et bactéries d'altération identifiées sur du poisson blanc frais (cabillaud) au moment de son altération (Huss, 1994).

Température de stockage	Atmosphère	Microflore dominante	Organismes Spécifiques d'Altération
0°C	Aérobie	Psychrotrophes à Gram-négatif, bâtonnets incapables de fermentation (<i>Pseudomonas Spp.</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i>)	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i>
	Sous vide	Bâtonnets à Gram-négatif, psychrotrophes ou à caractère psychrophile (<i>S. putrefaciens</i> , <i>Photobacterium</i>)	<i>S. putrefaciens</i> <i>P. phosphoreum</i>
	Emballage sous atmosphère modifiée (EAM)	Bâtonnets capables de fermentation à Gram- négatif à caractère psychrophile (<i>Photobacterium</i>) Bâtonnets psychrotrophes incapables de fermentation (1 à 10 % de la flore, <i>Pseudomonas</i> , <i>S. putrefaciens</i>), Bâtonnets à Gram-positif (bactéries lactiques)	<i>P. phosphoreum</i>
5°C	Aérobie	Bâtonnets psychrotrophes Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i> , <i>S. putrefaciens</i>)	<i>Aeromonas spp.</i> <i>S. putrefaciens</i>
	Sous vide	Bâtonnets psychrotrophes Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i> , <i>S. putrefaciens</i>)	<i>Aeromonas spp.</i> <i>S. putrefaciens</i>
	EAM	Bâtonnets psychrotrophes Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i>)	<i>Aeromonas spp</i>
20/30°C	Aérobie	Bâtonnets capables de fermentation mésophiles Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Aeromonas spp. Mobile</i> (<i>A. Hydrophila</i>)

Chaque poisson possède ses propres bactéries spécifiques d'altération (SSO) dont le nombre, à l'opposé du nombre total de bactéries, sera en rapport avec la durée de conservation (Gram & Dalgaard, 2002). Parmi les espèces bactériennes Gram-positives psychrophiles, *Brochothrix thermosphacta* a été détecté dans le saumon fumé (Leroi *et al.*, 1998) et son impact sensoriel dans la production de composés volatils chez différentes espèces de poissons a été démontré par Joffraud *et al.* (2001). Le genre *Carnobacterium maltaromaticum* a été incriminé dans l'altération des produits de transformation du saumon (Leroi *et al.*, 1998). Par ailleurs, les

bactéries Gram-négatives en particulier *Shewanella putrefaciens* est la principale bactérie responsable du phénomène de putréfaction qui survient au cours de l'altération du poisson (Figure 9). Elle est connue pour produire des composés volatils tels que la TMA ou des composés sulfurés (Gram & Melchiorson, 1996). Elle compose avec *Pseudomonas spp.* la flore d'altération exclusive des poissons marins tropicaux (Gram & Huss, 1996). Les poissons tropicaux d'eaux douces stockés sous glace sont la cible privilégiée de *Pseudomonas spp.* Par contre *P. phosphoreum* participe activement à l'altération du poisson emballé sous CO₂ (Gram *et al.*, 1990).

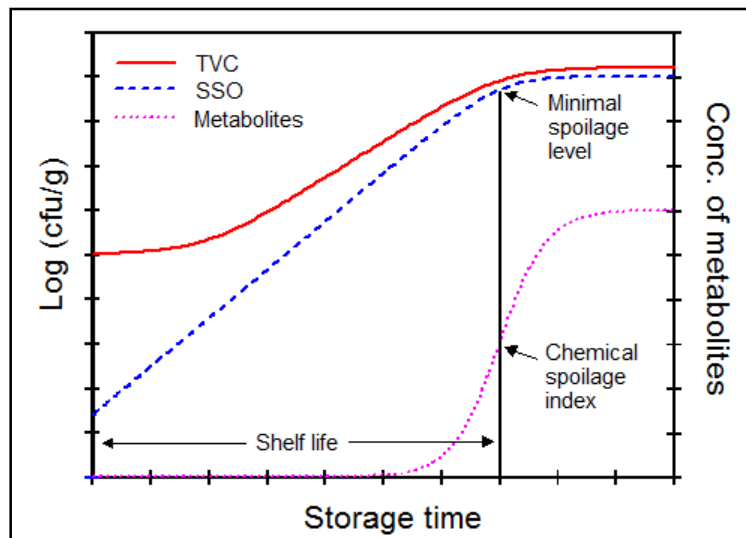


Figure 9: Changements typiques dans la flore totale (TVC), les organismes spécifiques d'altération (SSO) et les métabolites produits pendant la conservation des produits de la mer (Dalgaard, 2000).

III. SYSTÈME DE GESTION DE LA QUALITÉ

1. Introduction:

Il est difficile de définir avec précision la notion de qualité, intuitivement, la qualité correspond à la "valeur" d'une chose.

Le dictionnaire Larousse (2012) définit la qualité comme étant :

- ✚ L'ensemble des caractères, des propriétés qui font que quelque chose correspond bien ou mal à sa nature, à ce qu'on en attend.

- ✚ Chacun des aspects positifs de quelque chose qui font qu'il correspond au mieux à ce qu'on en attend.

Ces définitions, quoique justes, diffèrent cependant de celle employée par l'AFNOR (association française de normalisation) (1994) : "La qualité est l'aptitude d'un produit à satisfaire ses utilisateurs". Ou encore dans une définition plus complète décrite par

ISO 8402 : "c'est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites de tous les utilisateurs".

Huss (1994), a adapté une définition de la qualité aux produits aquacoles et produits de la pêche qui se réfère à l'aspect esthétique et à la fraîcheur ou au degré d'altération que la denrée a subi. Elle peut aussi comprendre des aspects de sécurité tels que l'absence de bactéries et parasites pathogènes ou de produits chimiques toxiques. Kolditz (2008), a étendu le sens de la qualité sur l'ensemble des caractéristiques morphologiques, histologiques, biochimiques et rhéologiques qui définissent les propriétés organoleptiques (texture, flaveur, couleur) et nutritionnelles du produit perçues par le consommateur. La qualité des poissons d'élevage recouvre à la fois les qualités nutritionnelles et organoleptiques de la chair, ainsi que l'aptitude à la transformation.

2. Classification :

Multon & Davenas (1994) ont décliné la qualité alimentaire en trois éléments principaux : la qualité hygiénique, la qualité nutritionnelle et la qualité organoleptique :

a. La qualité hygiénique :

Il s'agit de la "non-toxicité de l'aliment". La dose de l'élément toxique ne doit pas excéder le seuil acceptable pour le consommateur. La contamination peut être d'ordre chimique (ex. antibiotiques, hormones, métaux lourds, polluants et additifs), microbiologique (ex. bactéries, moisissures, trématodes, nématodes, cestodes, protozoaires et virus) ou physique (ex. bouts de filet de pêche et hameçon).

b. La qualité nutritionnelle :

C'est l'aptitude de l'aliment à bien nourrir d'un point de vue quantitatif (quantité d'énergie apportée, composition en protéines totales, en acides aminés indispensables, en eau, en acides gras, en minéraux et en vitamines) et/ou qualitatif (aliment équilibré nutritionnellement, aliment enrichi en un élément particulier pour répondre à un besoin précis ou au contraire dépourvu de certains composants dans un but préventif). Chez le poisson, la richesse en AGPI est le plus souvent convoitée. Le tilapia (poisson d'eau douce) possède une capacité supérieure, par rapport aux poissons marins, de bioconversion des acides gras en C18 de l'aliment en AGPI à chaîne plus longue ou plus insaturée par des systèmes enzymatique catalysant leur élongation et leur désaturation (Tocher *et al.*, 2002).

c. La qualité organoleptique :

L'aliment doit répondre à un certain standard de qualité sensorielle pour satisfaire le consommateur (couleur, flaveur, texture, aspect).

D'autres composantes de la qualité peuvent aussi être décrites telle que la qualité technologique qui correspond à la capacité à la transformation et à la conservation (Valfré & Moretti, 1991).

3. *Le système HACCP* :

Le concept du système HACCP est américain. Le sigle anglais: "Hasard Analysis Critical Control Point " signifie en français "Analyse des dangers - Point critique pour leur maîtrise". C'est une démarche objective qui repose sur des bases scientifiques et cohérentes. Elle définit des dangers spécifiques et indique les mesures à prendre en vue de les maîtriser et de garantir la salubrité de l'aliment. Le système HACCP est axé davantage sur la prévention que sur l'analyse du produit fini. Il est appliqué tout au long de la chaîne alimentaire, depuis la production primaire jusqu'à la consommation finale (de la ferme à la fourchette), en indiquant les contrôles d'hygiène qui doivent être exercés à chaque stade. Il exige une approche pluridisciplinaire (Codex alimentarius, 2003).

Initialement, c'est vers la fin des années 60 que le système HACCP a été créé aux USA par les industries chimiques. Il a été ultérieurement adapté au secteur alimentaire en 1972 par Pillsbury Corporation, industrie travaillant pour la NASA à la fabrication d'aliments pour les cosmonautes. Ce n'est qu'en 1975 que les experts de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) l'ont recommandé. Début des années quatre-vingt (1984), le système HACCP a été inclus dans les codes du Codex alimentarius, suivi par une 1^{ère} harmonisation internationale des définitions et des éléments de base proposée par le Codex alimentarius (ALINORM 97/13A) en 1993. Dans la même année, a été publiée la directive européenne 93/43/CE sur l'hygiène alimentaire qui recommande l'utilisation du système HACCP. Quant à son officialisation en Algérie, il a fallu attendre l'an 2010 pour que l'utilisation du système HACCP soit décrétée (J.O n°17 du 14 mars 2010).

La démarche HACCP est en avance dans le secteur de la transformation des produits aquacoles en comparaison à celui des élevages (Reilly & Kaferstein, 1997 ; Magras *et al.*, 2005). Avant de procéder à l'analyse systématique des risques (HACCP proprement dit), des programmes préalables (PRP) pratiques et essentiels doivent être mis en place. Ces programmes préalables (prérequis) sont fondés sur les bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et les bonnes pratiques aquacoles (BPA). L'élaboration de ces derniers permet à l'équipe HACCP de se concentrer sur l'application du système aux dangers menaçant la salubrité du poisson,

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

sans devoir à chaque fois examiner les dangers provenant du milieu ambiant. Ces programmes sont spécifiques à chaque établissement et nécessitent une surveillance et une évaluation afin d'assurer une efficacité permanente (AFSCA, 2011 ; Codex alimentarius, 2012a). Les programmes préalables représentent une partie intégrante du plan global du système HACCP qui prévoient une série de considérations, procédures et protocoles visant à favoriser une production aquacole efficace et responsable qui aide à assurer la qualité et la sécurité du produit final, et la durabilité environnementale (Vidacek, 2014). Les BPA et les BPH incluent des considérations pour :

- le choix du site, primordial afin d'éviter les contaminations microbiologiques et l'accumulation de polluants organiques et chimiques dans les eaux provenant des zones urbaines, industrielles ou agricoles voisines,
- l'ensemble des normes générales et spécifiques des infrastructures (nature et qualité des matériaux, des revêtements, des équipements, séparation des zones d'activités, paramètres zootechniques à respecter dans les bassins et étangs d'élevage...) des fermes aquacoles,
- les plans de nettoyage, de recyclage des eaux, d'assainissement et de lutte contre les nuisibles,
- le respect de la marche en avant (du plus sale au plus sain) permettant d'éviter les contaminations croisées via le personnel, les matériaux et les déchets,
- les bonnes pratiques vétérinaires (BPV) en matière d'antibiothérapie et d'hormonothérapie,
- le contrôle des fournisseurs, des matières premières, des produits chimiques, des médicaments vétérinaires, de la qualité microbiologique et chimique de l'eau et de la glace,
- l'hygiène et la formation du personnel,
- la formulation de l'aliment d'élevage en appliquant les bonnes pratiques de fabrication (BPF),
- le stockage des aliments dans des conditions optimales d'hygiène (local abrité, aéré, température < 20 °C et humidité relative < 60 %),
- le contrôle des moyens de transport des poissons, des caisses et la traçabilité des produits.

Le fait de respecter les différentes normes sus-mentionnées permettra d'assurer un bien-être animal pour les poissons et de garantir les meilleures conditions biotiques et abiotiques.

Parmi les facteurs abiotiques figurent divers paramètres de qualité de l'eau tels que la teneur en oxygène, le pH, la salinité et la température, mais aussi les procédures de gestion appliquées, les types de bassins et d'étangs utilisés et certaines pratiques de manipulation et de tri du

poisson. Les facteurs biotiques sont la densité de poissons dans les élevages, l'alimentation, la génétique et l'état sanitaire (Hastein, 2007).

Pour appliquer le système HACCP en aquaculture, il faut examiner soigneusement la nature et l'importance des dangers éventuellement associés aux produits et aux méthodes de production. Une douzaine d'étapes successives comprenant sept principes sont indispensables pour son instauration (Figure 10).

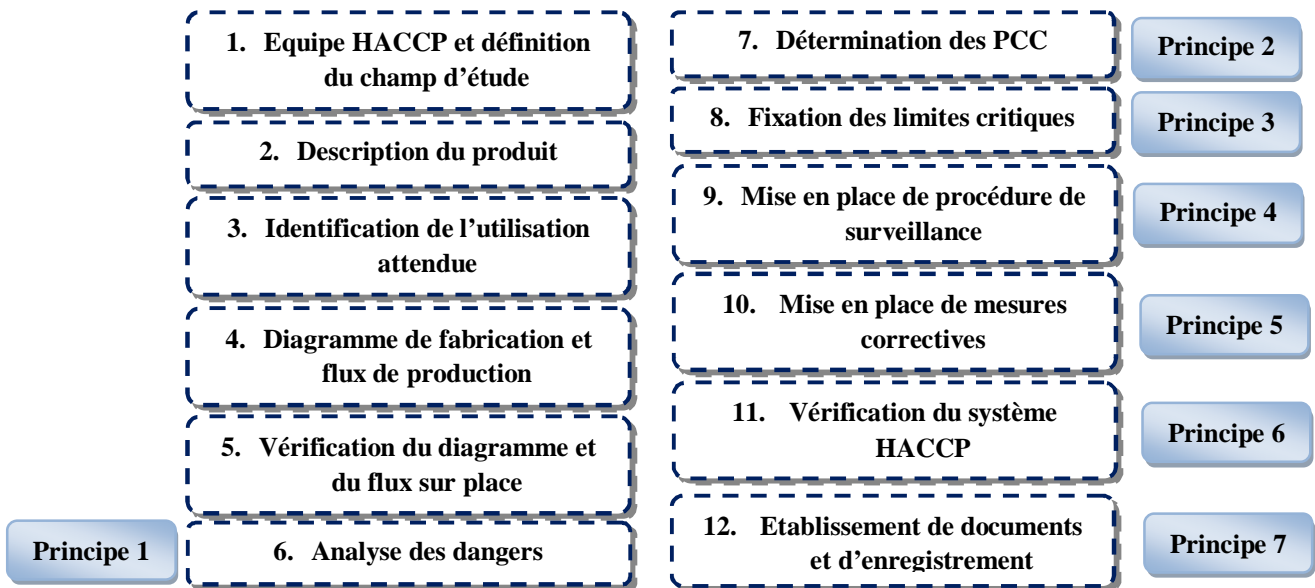


Figure 10 : Etapes et principes du système HACCP (Codex Alimentarius, 1997).

Les cinq premières étapes du plan HACCP sont préliminaires :

- Constitution d'une équipe HACCP pluridisciplinaire (étape 1) réunissant des experts d'horizons différents (zootechnie, aquaculture, sciences vétérinaires, biochimie, microbiologie, biotechnologie, etc...). Cette équipe est responsable de la planification, de l'analyse et de l'amélioration des procédures de contrôle et de maîtrise des dangers.
- Description détaillée du produit (poisson) (étape 2), en déterminant ses caractéristiques physico-chimiques (pH, Aw, humidité, composition en macronutriments et micronutriments, profile en acides gras et en acides aminés...) et en précisant le mode de conditionnement (barquettes, sous vide, sous atmosphère modifiée, emballage alimentaire), la durée de conservation (72 heures à 4°C et 03 mois à -18°C), son mode de commercialisation (poisson entier éviscéré ou non, filets de poissons) et les conditions d'entreposage et de conservation (réfrigération à 4°C, congélation à -18°C, état frais à température ambiante) et de distribution (camions frigorifiques).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- Détermination de son utilisation prévue (étape 3) : il faut préciser le mode d'emploi (frais, mariné, grillé, frit, fumé, ...etc.), les modalités de conservation chez le distributeur. Il est notamment important d'identifier tout mode d'utilisation qui pourrait augmenter un risque sanitaire donné ainsi que tout consommateur susceptible aux risques identifiés (enfants en bas âge, femmes enceintes, personnes âgées, ...etc.).
- Etablissement d'un diagramme de production et vérification de sa cohérence sur site (étape 4 & 5) : il s'agit de schématiser l'ensemble des étapes successives du process, depuis la phase d'élevage jusqu'à la commercialisation, et le flux des intrants qui y interagissent. Ce diagramme sera vérifié, détaillé et validé sur place (ferme aquacole).

Les étapes subséquentes résident dans l'application des sept principes du système HACCP adaptés ci-dessous à l'aquaculture selon le Codex Alimentarius (2012a) :

- ✱ Principe 1 : Effectuer une analyse des dangers en identifiant et en évaluant les dangers potentiels (microbiologiques, physiques et chimiques) associés à chacun des stades de la production aquacole ; apprécier la probabilité pour que ces dangers se concrétisent et identifier les mesures permettant d'y parer.
- ✱ Principe 2 : Déterminer les points de contrôle critiques (PCC) : Un point critique pour la maîtrise (PCC) est une étape (point, procédure, opération ou stade) à laquelle une mesure de maîtrise peut être exercée et est essentielle pour prévenir ou éliminer un danger menaçant la sécurité sanitaire des aliments ou le ramener à un niveau acceptable (NF V01-006, 2008). Cette détermination se fait à l'aide d'un arbre de décision (Figure 11).
- ✱ Principe 3 : Fixer des limites critiques pour chaque PCC sur des bases expérimentales, à partir de la réglementation en vigueur ou à partir de la littérature.
- ✱ Principe 4 : Mettre en place un système de surveillance du PCC.
- ✱ Principe 5 : Définir les mesures correctives à prendre lorsque la surveillance montre qu'un PCC particulier n'est pas maîtrisé.
- ✱ Principe 6 : Etablir des procédures de vérification comportant des essais et des protocoles supplémentaires pour confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement.
- ✱ Principe 7 : Mettre en place un système de documentation sur l'ensemble des protocoles ainsi qu'un système de tenue de dossiers adapté aux principes ci-dessus et à leur application.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

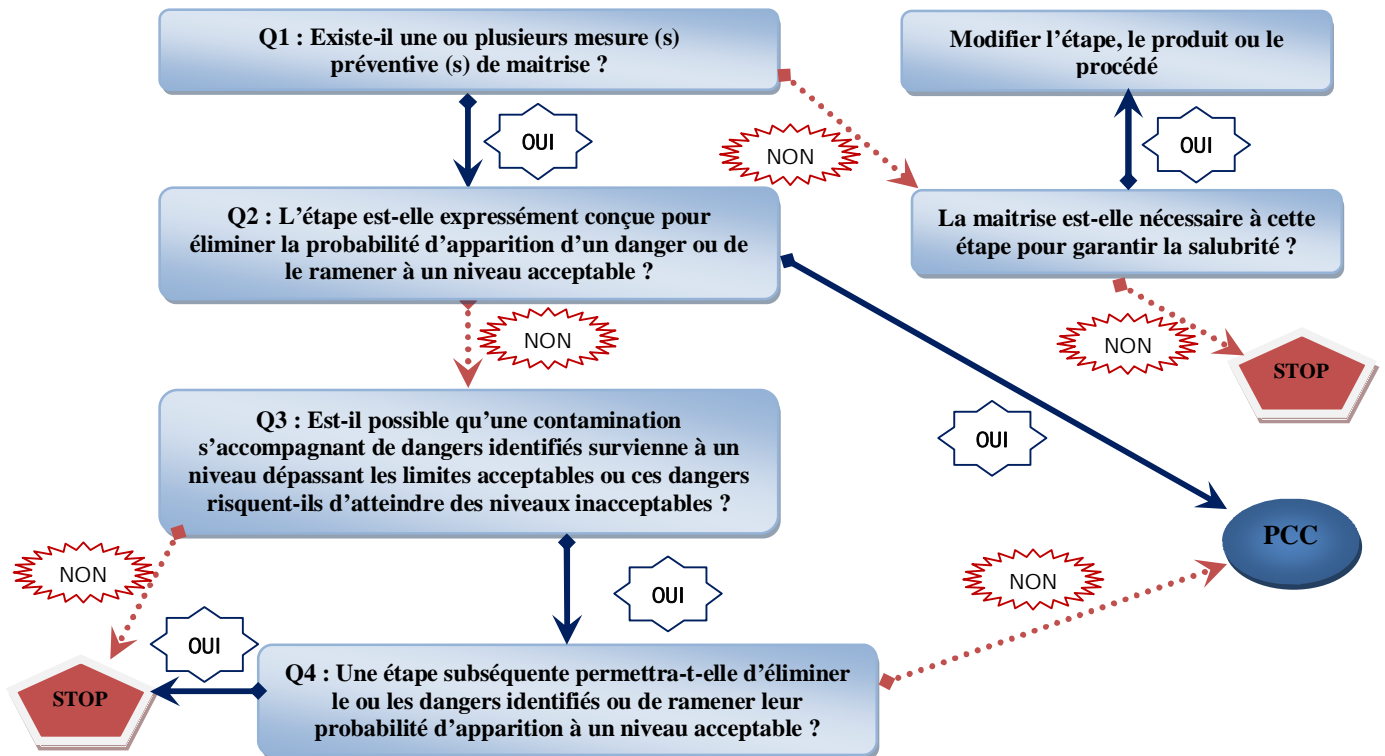


Figure 11: Exemple d'arbre de décision selon le Codex Alimentarius (1997).

Les quatre questions (Q1-Q4) sont posées successivement, PCC : point de contrôle critique.

IV. MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

Les produits aquacoles peuvent constituer un danger avéré pour le consommateur lorsqu'ils contiennent des résidus de certains médicaments vétérinaires (Lupin *et al.*, 2003). Ces derniers sont généralement subdivisés en deux groupes : les substances antibactériennes et les médicaments vétérinaires autres que les antibiotiques (Lupin, 2009). Certaines substances appartenant à ces groupes font l'objet de limites maximales de résidus (LMR) (Règlement n° 37/2010) (UE, 2010) et sont approuvées pour leur utilisation en aquaculture, alors que d'autres sont prohibées (Codex Alimentarius, 2012b). Néanmoins, un médicament pourrait être accepté dans un pays et pas dans un autre en fonction de la législation locale en vigueur.

La tilapiculture mondiale repose essentiellement sur l'élevage intensif. Ce type de production expose les poissons à de graves maladies bactériennes dont les agents pathogènes sont : *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp. *Clostridium botulinum* type C, *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium columnare*, *Mycobacterium marinum*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E) et *Vibrio* spp...etc. (Plumb & Hanson, 2010). En effet, la densité élevée d'animaux induit un stress favorisant

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

l'apparition de maladies multiples et la transmission rapide des germes (Casillas-Hernandez *et al.*, 2012).

En dépit d'une utilisation accrue de la vaccination et d'une meilleure surveillance du milieu d'élevage, l'utilisation des antibiotiques est aujourd'hui encore incontournable pour réduire efficacement de façon préventive ou curative les épisodes pathologiques dans les élevages aquacoles (Hernandez Seranno, 2005). En Europe, au Canada, aux USA et au Japon, la liste d'antibiotiques autorisés en aquaculture est très restreinte, elle se limite à : l'oxytétracycline, le florfenicol, la sarafloxacin, l'érythromycine, les sulfamides (triméthoprime, ormetoprime) (Kümmerer, 2009) et quelques fluoroquinolones (acide oxolinique compris) qui sont manifestement interdits aux USA (Hernandez Seranno, 2005).

Par ailleurs, les plus grands producteurs et exportateurs de produits aquacoles se trouvent en Asie (Chine, Inde, Vietnam, Indonésie, Bangladesh, Thaïlande, Philippines), en Amérique latine (Chili et le Brésil) et en Afrique (Égypte) où l'antibiothérapie est utilisée de manière intempestive (les substances prohibées sont toujours administrées). Parmi ces antibactériens interdits, figure le chloramphénicol qui a été exclu de la médecine vétérinaire suite aux préoccupations exprimées au sujet de sa cytotoxicité, sa reprotoxicité et son effet mutagène : potentiel carcinogène chez les humains et les troubles hématologiques qu'il engendre (une anémie aplasique due à une dépression réversible de l'érythropoïèse ou à une pancytopenie provoquée par une aplasie médullaire irréversible) (Lu *et al.*, 2009). Les nitrofuranes sont couramment utilisés en tant que promoteurs de croissance, dans les traitements prophylactiques et thérapeutiques des infections bactériennes et contre les protozoaires (Hassan *et al.*, 2013). Leur utilisation est complètement bannie depuis 1995 dans l'Union Européenne (EC, 1995) en raison de l'effet cancérogène de leurs métabolites qui forment des adduits sur l'ADN. Après ingestion, les nitrofuranes (molécules mères) sont rapidement métabolisés en furazolidone, nitrofurazone, furaltadone et en nitrofurantoïne. Ces derniers se lient avec les protéines et persistent plusieurs semaines dans le corps après le traitement (Cooper *et al.*, 2005).

La commission jointe de la FAO, l'OMS et l'Office international des épizooties (OIE) ont déjà soulevé la question de l'utilisation irresponsable des antibiotiques dans tous les secteurs de production aquacole, avec une attention particulière portée aux risques potentiels pour la santé publique et pour l'environnement (FAO/OIE/WHO, 2006). Ces risques sont liés aux problèmes d'antibiorésistance (apparition de gènes de résistance et émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques) (Rolain, 2013), et au dépassement des limites maximales de résidus d'antibiotiques dans les produits de l'aquaculture.

1. *L'acide oxolinique* :

L'acide oxolinique (OXO) est un antibiotique de synthèse appartenant à la famille des quinolones. Il appartient avec l'acide nalidixique au groupe des quinolones de première génération. Il a été introduit en thérapeutique humaine en 1974. Il possède une activité bactéricide à spectre étroit contre les bactéries Gram négatif (Austin *et al.*, 1983). En Algérie, l'acide oxolinique est couramment administré (seul ou en association) pour limiter l'impact des bactérioses dans les élevages aquacoles (tilapiculture) et avicoles.

1.1. Structure

Sur le plan structural (Figure 12), l'acide oxolinique (C₁₃H₁₁NO₅) se caractérise par :

- ✚ un noyau aromatique hétérocyclique et une fonction acétal cyclique, le noyau 4-oxo-1,4-dihydroquinoline,
- ✚ une fonction cétone R–CO–R' en position *para* de l'azote hétérocyclique,
- ✚ une fonction acide carboxylique –COOH en position *meta* de l'azote hétérocyclique.

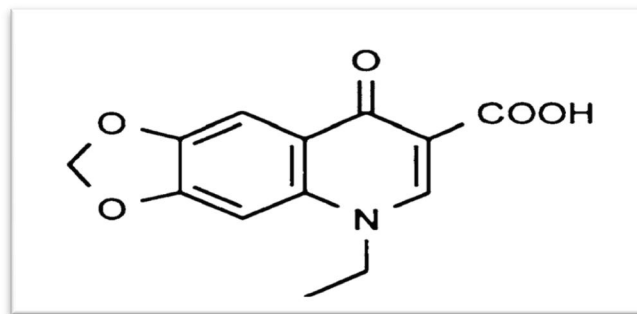


Figure 12 : Structure de la molécule d'acide oxolinique (Paschoal *et al.*, 2009).

1.2. Propriétés physicochimiques

L'acide oxolinique se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche. Il a une masse molaire de 261,2 g et un point de fusion de 313 °C. Sous sa forme non ionisée, il est insoluble dans les solutions aqueuses mais soluble dans les solvants apolaires. Sous sa forme ionisée, il est soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool et très peu soluble dans les solvants apolaires. L'acide oxolinique est considéré comme une molécule assez stable, du fait de sa faible sensibilité à la lumière et à la chaleur en présence d'oxygène (Lunestad *et al.*, 1995 ; Coyne *et al.*, 2004).

1.3. Mécanisme d'action

L'acide oxolinique possède un spectre d'activité étroit dirigé contre les bactéries Gram-négatif affectant les espèces aquacoles (Austin *et al.*, 1983), en particulier les entérobactéries.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

De ce fait, il présente un grand intérêt en pisciculture contre la majorité des infections bactériennes rencontrées, à savoir, la vibriose, yersiniose, furunculose et la pasteurellose (Hustved *et al.*, 1992 ; Samuelson & Bergh, 2004). Son activité antibactérienne dépend de la nature de la souche pathogène présente et des caractéristiques du milieu dans lequel il se trouve (pH, température, salinité et le taux de certains cations bivalents) (Pouliquen & Le Bris, 1996). Selon Smith (1998), l'effet bactéricide des quinolones peut se résumer à la capacité de traverser la paroi bactérienne par les porines, à inhiber l'action de l'ADN gyrase et à empêcher ainsi la réplication et de la transcription de l'ADN chromosomique bactérien. Hooper (2002), précise que le mécanisme antibactérien des quinolones agit sur deux cibles, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (enzyme la plus sensible des bactéries Gram négatif) qui possèdent chacune deux sous-unités appelées respectivement GyrA, GyrB et ParC et ParE. La structure de GyrA est similaire à celle de ParC et celle de GyrB est similaire à celle de ParE. Les quinolones forment un complexe ternaire quinolone-ADN-ADN gyrase ou topoisomérase IV qui bloquerait la fourche de réplication en empêchant la progression des enzymes le long de l'ADN. L'ADN gyrase est responsable du surenroulement des chaînes d'ADN assurant la compaction du matériel génétique et la topoisomérase IV agit en décaténant les doubles brins d'ADN circulaires issus de la réplication du chromosome et des plasmides (Figure 13).

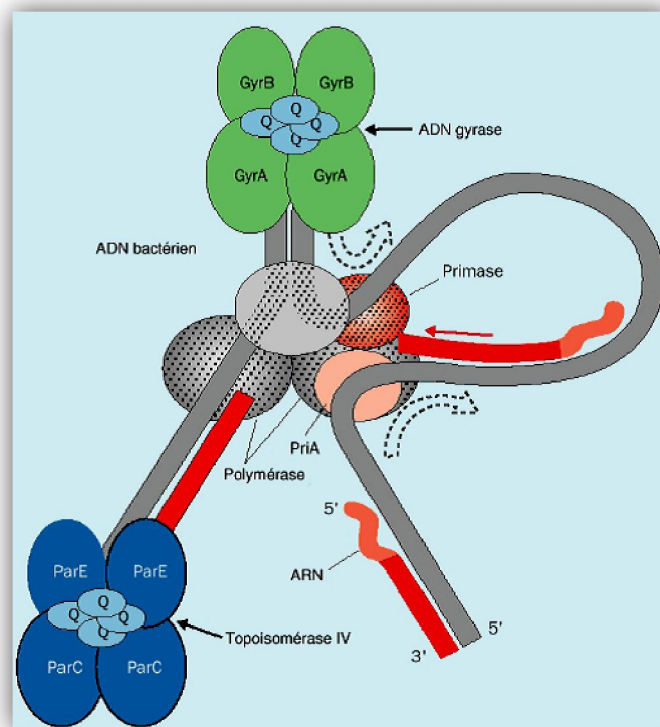


Figure 13 : Structure de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, cibles de l'acide oxolinique (Hooper, 2002).

1.4. Pharmacocinétique de l'acide oxolinique chez le poisson

La pharmacocinétique permet de décrire le devenir d'un antibiotique dans un organisme et son élimination.

1.4.1. **Résorption**

La résorption d'un antibiotique est largement dépendante de la voie d'administration utilisée. Chez les poissons adultes, les antibiotiques sont principalement administrés par voie orale (Rogstad *et al.*, 1993 ; Coyne *et al.*, 2005) sous forme d'aliments médicamenteux. L'antibiotique est incorporé dans l'aliment du poisson pendant sa fabrication, par enrobage des granulés avec de l'huile (voir partie expérimentale). Par contre, les alevins et les juvéniles sont plus facilement traités par voie balnéatoire (Scott, 1993). Il existe une troisième forme réservée aux géniteurs qui est la voie parentérale en intraveineuse (Ishida, 1992 ; Poher *et al.*, 1997) ou en intramusculaire (Doi *et al.*, 1998). Bjorklund & Bylund (1991) ont démontré que les facteurs pharmacocinétiques dépendent à la fois de la nature chimique du médicament, de l'espèce étudiée et de ses conditions physiologiques. La physiologie du poisson est très affectée par la qualité physicochimique de l'eau dans laquelle il évolue, en particulier la température. La biodisponibilité orale absolue de l'acide oxolinique, c'est-à-dire la quantité absorbée au niveau digestif lors d'une administration par voie orale, est comprise entre 13,6 et 40,0 % chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) et le saumon (*Salmo salar L.*) respectivement (Bjorklund & Bylund, 1991 ; Hustvedt *et al.*, 1991b). Elle est fortement influencée par la dose administrée et augmente lorsque celle-ci diminue (Cravedi *et al.*, 1987). L'administration d'acide oxolinique sous forme d'ester de carbitol permet d'améliorer sa biodisponibilité de 25 à 71 % chez le saumon (*Salmo salar L.*) (Samuelsen *et al.*, 2000) du fait d'une augmentation de la lipophilie des molécules estérifiées.

1.4.2. **Distribution**

La distribution de l'acide oxolinique, du fait de ses caractéristiques lipophile et acide semble plutôt extracellulaire et rapide (Bjorklund *et al.*, 1992). Sa liaison aux protéines plasmatiques est assez faible. L'étude de Guichard (2000) réalisée chez le turbot (*Psetta maxima*, L. 1758) a montré qu'après administration orale, l'acide oxolinique se distribue dans les reins, le foie, le tissu musculaire, la graisse, la peau et l'os.

1.4.3. **Biotransformations**

L'acide oxolinique subit quelques biotransformations chez les poissons ; celles-ci se limitent à des hydroxylations et des glucuroconjugaisons. Deux métabolites d'hydroxylation : les acides 6-hydroxy-oxolinique et 7-hydroxy-oxolinique ont été identifiés chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Ishida, 1990b) et trois métabolites de conjugaison : glucuroconjugué

de l'acide oxolinique et deux dérivés (7-hydroxy-6-methoxy et 6-hydroxy-7-methoxy) ont été identifiés dans la bile chez plusieurs espèces de téléostéens d'eau douce et de mer (Ishida, 1990a).

1.4.4. *Elimination*

La demi-vie des antibiotiques chez le poisson est fonction de la posologie, de l'espèce, de la température, de la salinité, et du pH de l'eau. L'acide oxolinique est rapidement éliminé via la matière fécale et les urines sous forme inchangée ou non (Hustvedt *et al.*, 1991a ; Bjorklund *et al.*, 1992). Son élimination est plus rapide chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) d'eau de mer que la truite (*Salmo trutta*) d'eau douce (Ishida, 1992), à température basse et à pH élevé (Endo & Onozawa, 1987b) et selon la taille des particules de l'aliment médicamenteux formulé (Endo & Onozawa, 1987a). Selon Guichard (2000), le temps de demi-vie de l'acide oxolinique chez les poissons peut varier de 10 heures à 6 jours.

1.5. Dose et Toxicité

En général, les effets toxiques des quinolones, l'acide oxolinique compris, administrées par voie orale chez les poissons sont faibles. La dose létale (DL₅₀) serait de 4000 mg/kg chez la carpe (*Cyprinus carpio*) (Endo *et al.*, 1973).

La dose thérapeutique recommandée par les firmes pharmaceutiques est de 12mg/kg de poids vif pendant six jours consécutifs.

1.6. Méthodes de contrôle des résidus d'antibiotiques chez le poisson

Plusieurs méthodes permettent de doser les antibiotiques dans n'importe quelle matrice (sérum, matière fécale, urine, chair, abats, etc...). Les techniques utilisées peuvent être d'ordres microbiologiques, physicochimiques ou immunologiques. Le choix de la méthode est généralement fondé sur sa sensibilité, sa sélectivité, son adéquation avec les objectifs recherchés (screening ou quantification) et sa facilité d'utilisation (Guichard, 2000).

Maguin-Rogister (2002) préconise que la stratégie idéale de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale devrait comporter principalement deux phases :

1.6.1. *Le screening* (dépistage) :

Dans cette phase, on tente de repérer certaines substances ou famille d'antibiotiques. Cette détection se fait au moyen d'immuno-essais, de tests biochimiques (Belal *et al.*, 1999 ; Scippo & Maguin-Rogister, 2006) ou généralement de tests microbiologiques (Barker, 1994). Ces méthodes ont l'avantage de pouvoir traiter de nombreux échantillons avec un équipement

relativement simple. Un résultat positif lors d'un test de dépistage doit être considéré comme potentiellement douteux en raison d'interférences possibles (risques de faux positifs).

Plusieurs protocoles microbiologiques ont été développés. En Europe, la méthode de référence pour le tissu rénal est la méthode européenne CEE des quatre plaques (méthode de Silverman & Kosikowski rapportée par Korsrub & MacNeil, 1988). Ce test microbiologique est basé sur l'inhibition de la croissance des souches bactériennes, préalablement ensemencées dans les plaques (milieu Agar), en présence d'antibiotiques. Cette méthode a connu plusieurs variantes pour la rendre plus sensible, par exemple en modifiant les souches (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus*, etc...), les milieux de culture (Pikkemaat *et al.*, 2008) ou en réalisant une extraction des résidus au préalable (Dang *et al.*, 2010).

Il existe également une version du test microbiologique en tubes prêts à l'emploi, le Premi[®] Test (DSM, NL). Son principe se base sur l'inhibition du développement de *Bacillus stearothermophilus* inoculé dans un milieu nutritif. Après l'ajout de jus de viande ou de poisson, le tube est incubé à 64°C pendant 3 heures de manière à induire le développement bactérien. Le milieu nutritif contient un indicateur de pH, qui est mauve au départ, et vire à la couleur jaune après le développement bactérien, en raison de l'acidification du milieu. En présence d'antibiotiques, le développement bactérien est inhibé et le milieu reste de couleur mauve. Stead *et al.* (2004) ont amélioré la sensibilité de cette technique en ajoutant une phase d'extraction au lieu d'utiliser un jus tissulaire.

D'autres kits plus onéreux mais simples et rapides, sont prêts à l'emploi et spécifiques de la matrice choisie et de la molécule pharmaceutique recherchée (béta-lactames, sulfonamides, tétracyclines, etc...). Ce sont généralement des tests sur tigelette que l'on pourra utiliser à un stade de post-screening.

1.6.2. La confirmation (quantification) :

La confirmation d'un résultat positif et la quantification après l'étape du screening sont réalisées au moyen d'une méthode d'analyse qui permet l'identification de la substance responsable du résultat positif lors du dépistage. Du fait que les valeurs de LMR peuvent varier d'une substance à l'autre au sein d'une même famille et que pour certaines substances, aucune valeur limite n'est fixée, une identification non ambiguë du résidu est indispensable. La technique la plus utilisée pour la quantification est une chromatographie liquide (LC) couplée à différents détecteurs spectrométriques : Ultra-violet (Ueno *et al.*, 1999), Fluorescence (Karbiwnyk *et al.*, 2007) ou de Masse qui est de loin la détection de référence comme étant la plus sensible (Samanidou *et al.*, 2008).

L'Union Européenne impose aux laboratoires officiels de contrôle des résidus d'utiliser pour l'étape de la confirmation, la spectrométrie de masse (MS). Seule technique qui permet l'identification univoque de la molécule présente dans l'échantillon (Décision de la Commission Européenne 2002/657/CE).

2. *Hormone (17 α -méthyle testostérone) :*

La 17 α -méthyle testostérone est un composé cristallin blanc vendu sous forme de poudre ou de comprimés. De structure chimique C₂₀H₃₀O₂, elle est également désignée par : 17 beta-Hydroxy-17alpha-methyl-4-androsten-3-one (Figure 14). La 17 α -méthyle testostérone est indiquée par le n° CAS (Chemical Abstracts Service) : 58-18-4.

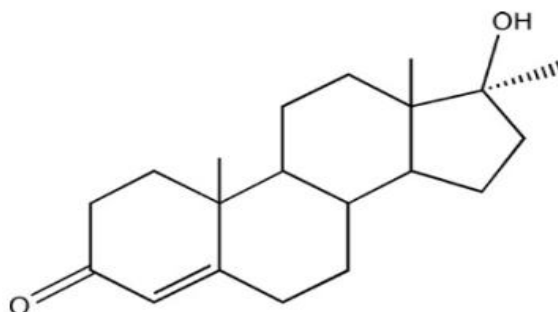


Figure 14 : Structure chimique de la 17 α -méthyle testostérone (Barry *et al.*, 2007).

C'est une hormone stéroïde de synthèse à effets anabolisant et androgénique qui fait partie du groupe des SAA (Stéroïdes Anabolisants Androgènes) exogènes. Elle promeut à la fois la croissance musculaire et le développement du caractère sexuel masculin. La MT mime l'effet de la testostérone naturelle. Elle a été largement utilisée en médecine humaine comme traitement de suppléance dans les cas de déficience hormonale en testostérone chez les hommes (Bhasin *et al.*, 1998). Elle a aussi été employée pour le traitement du cancer du sein et des douleurs mammaires. Sous l'appellation "17aa-1-testosterone", la MT est souvent convoitée par les body-builders et les gens souhaitant perdre du poids. En élevage, elle accélère le gain pondéral des bovins et des ovins (Shore & Shemesh, 2003).

En aquaculture, le recours à l'hormone 17 α -méthyle testostérone (MT) est une pratique courante dans de nombreuses régions du monde afin d'induire une inversion sexuelle (masculinisation) dans les élevages de tilapia. C'est une manipulation simple et fiable pour produire des populations monosexue male. Ces derniers croissent plus rapidement et atteignent une taille plus uniforme que ceux du sexe mixte ou entièrement féminin (Charborty *et al.*, 2011). Les tilapias traités grandissent à un minimum de 1,2 % de plus que les non traités

(Macintosh, 2008 ; Montajami, 2012). La réussite du traitement hormonal dépend principalement de la dose du traitement utilisée (Barry *et al.*, 2007), du temps d'initiation pour le traitement (larves âgées de 7 à 12 jours post-éclosion) (Teichert-Coddington *et al.*, 2000) et de la durée du traitement (classiquement, 21 ou 28 jours) (Abucay & Mair, 1997).

Pour les marchés européens, la taille marchande recommandée pour le tilapia dépasse les 600 g (taille atteinte au bout de 10 mois d'élevage). A ce stade de production, la différence de poids corporel entre les *Oreochromis niloticus* mâles et femelles est significative, le mâle double carrément de poids par rapport à la femelle d'où l'intérêt économique d'avantager et de perpétuer cette manipulation hormonale. En Afrique ou en Asie, la taille marchande est nettement inférieure, elle est d'un maximum de 300g. En Algérie, puisque la tilapiculture est une nouvelle discipline, les producteurs prévoient des élevages saisonniers (avril – octobre) et se contentent d'une centaine de grammes afin de fournir des pièces de poissons entiers qui seront frits ou grillés selon les deux modes de cuisson les plus courants en Algérie. Bien que le traitement hormonal existe depuis les années soixante, l'impact du traitement par la MT reste méconnu. L'utilisation de la MT en production animale a souvent été contestée en raison de sa toxicité potentielle sur la santé publique (propriétés cancérogènes et perturbation endocrinienne) et des dangers pour l'environnement (Aman *et al.*, 2006 ; Hulak *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2010). L'utilisation de stéroïdes anabolisants (MT compris) pour favoriser l'engraissement d'animaux est interdite par la FDA (Food and Drug Administration) des Etats-Unis d'Amérique (USA) (Aman *et al.*, 2006 ; De Brabander *et al.*, 2009) et par la directive européenne 2003/74/CE (EU, 2003). Quant à l'Algérie, dans l'attente de l'établissement de textes législatifs (inexistants) spécifiques à l'utilisation des médicaments vétérinaires en générale et les stéroïdes en particulier, le risque lié à l'utilisation de MT peut être pris en compte dans le cadre de la loi nationale n° 09-03 du 25 février 2009 concernant la protection des consommateurs et de la répression des fraudes (JORADP, 2009) aussi bien que le décret exécutif n° 10-90 du 10 mars 2010 concernant l'instauration du système HACCP (article 3) dans les établissements de denrées alimentaires (JORADP, 2010).

Afin de limiter le risque chimique de la MT, des recommandations sanitaires sont à respecter précautionneusement par les aquaculteurs (Macintosh, 2008 ; Khalil *et al.*, 2011) au niveau des délais du traitement hormonal, au niveau de la manipulation de la MT et au niveau des rejets des eaux d'écloseries. Idéalement, le traitement hormonal (MT) des tilapias est limité au stade larvaire précoce (moins d'1 mois d'âge). Le dosage de l'aliment médicamenteux est limité à un maximum de 60 mg MT/kg (Celik *et al.*, 2011). La durée d'élevage des juvéniles de tilapia traités par la MT devrait dépasser les cinq mois après l'administration de l'hormone

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

(Khalil *et al.*, 2011). Des restrictions sont impérativement instaurées au niveau des fermes aquacoles pour l'utilisation et le stockage de l'hormone. Le port des gants en latex et d'un masque protecteur lors de la préparation de l'aliment médicamenteux afin d'éviter le contact cutané ou d'inhaler la MT est indispensable (Macintosh, 2008). Bien que les eaux rejetées provenant des écloseries de tilapia ne représentent qu'une infime fraction de la décharge totale d'hormones dans l'environnement, une approche prudente devrait être prise. L'hormone est libérée à partir de la nourriture non consommée, par excrétion fécale et urinaire et via les branchies. Les eaux usées issues des écloseries doivent être recyclées et filtrées, ou retenues pendant plusieurs jours avant d'être relâchées dans la nature (Cole *et al.*, 2009).

Au cours du temps, plusieurs méthodes ont été développées et validées pour la détection et la quantification des stéroïdes anabolisants (17 α -méthyle testostérone) et de leurs métabolites dans diverses matrices biologiques. Des méthodes complexes et onéreuses sont disponibles, telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Gomez *et al.*, 2013), chromatographie liquide couplée à spectrophotomètre UV (Vick & Hayton, 2001 ; Marwah *et al.*, 2005) ou à la spectrométrie de masse (Chu *et al.*, 2006 ; Pozo *et al.*, 2009). D'autres méthodes alternatives nettement plus simples, rapides, sensibles et rentables pour le screening et la quantification de la MT sont également disponibles. Habituellement, des tests immuno-essais sont recommandés pour le screening des résidus d'hormones androgènes et de leurs métabolites. Ces derniers sont basés sur les radio-immuno-analyses (RIA) appliquées avec des précautions contre les composés radioactifs (Contreras-Sanchez *et al.*, 2001). De façon moins contraignante, des kits ELISA sont plus pratiques afin d'analyser plusieurs échantillons à la fois (Lu *et al.*, 2006).

MATERIELS & METHODES

MATERIELS & METHODES

Les différentes expériences réalisées dans le cadre de cette thèse suivent une logique classique selon la démarche du système HACCP, comme illustré dans le schéma suivant :

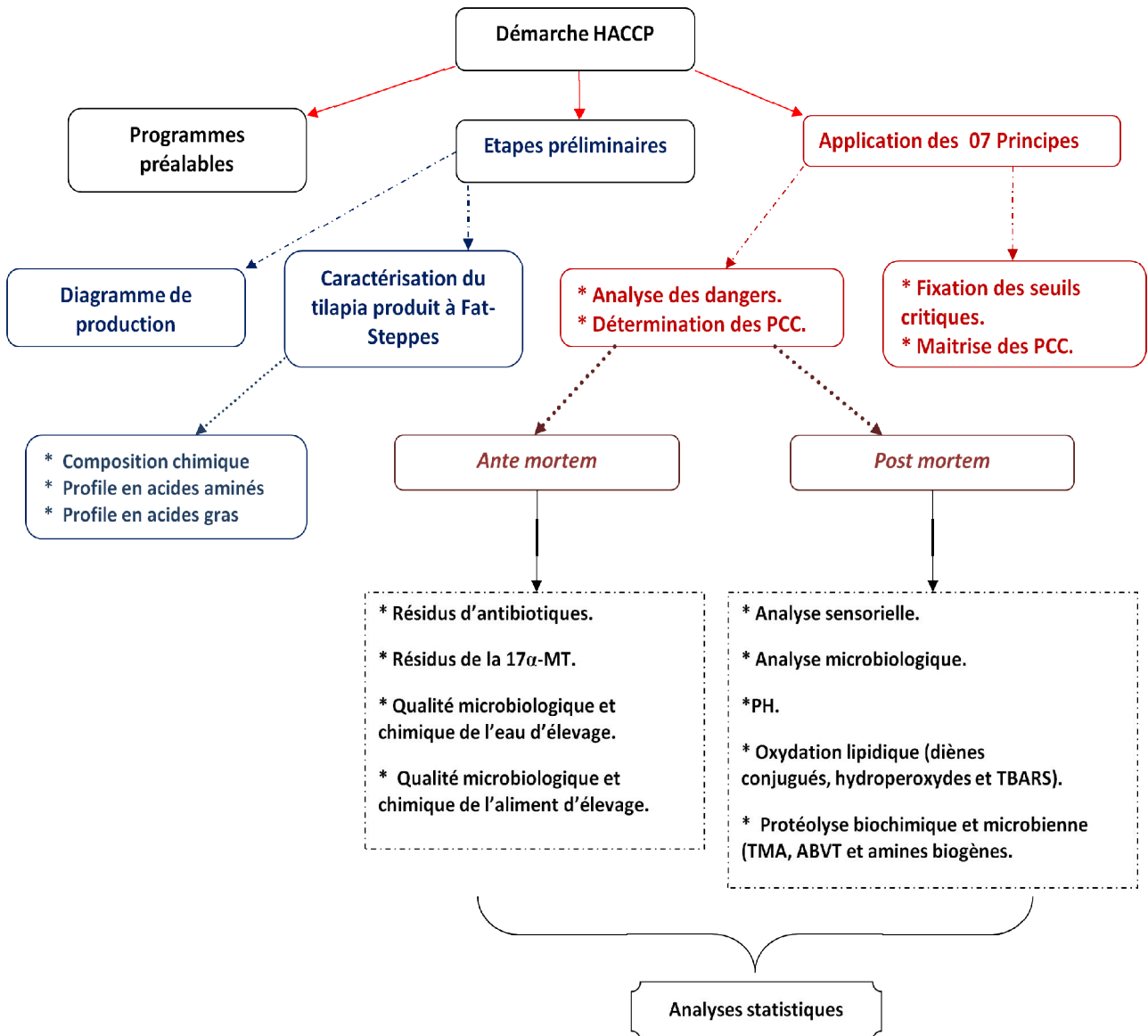


Schéma 1 : Schéma représentatif des expériences réalisées.

I. DEMARCHE HACCP

En respectant la démarche classique du système HACCP décrite dans le code d'usages pour les poissons et les produits de la pêche du Codex Alimentarius (2012a), nous avons procédé comme suit:

1. *Evaluation des programmes préalables à L'HACCP:*

Nous avons commencé par l'évaluation des programmes préalables établis au niveau de la ferme aquacole "Fat-Steppes". Pour ce faire, nous avons décrit cette exploitation et schématisé son plan. Nous avons également réalisé un état des lieux de la ferme aquacole afin d'apprécier les différentes bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et les bonnes pratiques aquacoles (BPA) mises en place. Cette évaluation sera présentée au début de la partie des résultats / démarche HACCP.

2. *Application du système HACCP :*

Nous avons appliqué les 12 étapes successives du système HACCP proprement dit, à commencer par les 05 premières étapes préliminaires (constitution d'une équipe, description du tilapia et son utilisation prévue, établissement du diagramme de fabrication et sa vérification sur place) suivi des sept dernières étapes correspondant aux 07 principes de l'HACCP (procéder à une analyse des risques, déterminer les points critiques pour les maîtriser, fixer les seuils critiques, mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les PCC, déterminer les mesures correctives à prendre lorsque la surveillance révèle qu'un PCC donné n'est pas maîtrisé, appliquer des procédures de vérification afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement et enfin constituer un dossier dans lequel figureront toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application.

2.1. Etapes préliminaires de l'HACCP

2.1.1. *Définir le champ de l'étude :*

Ce point correspond aux objectifs ciblés par cette étude fondamentale et pratique sur le développement d'un système spécifique de gestion de la qualité du tilapia dans l'Ouest algérien.

2.1.2. *Caractérisation du tilapia (*O. niloticus*) produit à Fat-Steppes*

a. **Composition et caractéristiques chimiques de la chair du tilapia**

Les lipides ont été extraits selon la méthode de Soxhlet ISO 1444. Le pourcentage des protéines a été déterminé par la technique de Kjeldahl (la valeur d'azote total a été multipliée par 6,25) selon la méthode ISO 937. Le pourcentage des cendres a été mesuré par la méthode ISO 936.

MATERIELS & METHODES

L'humidité du tilapia entier a été mesurée par la méthode ISO 1442. Les analyses ont été réalisées en triple sur le muscle dorsal du tilapia.

✚ L'activité de l'eau (A_w) a été déterminée par un Thermoconstanter TH200 Novasina (Novasina, Switzerland) selon la méthode ISO 21807.

b. Profil en acides gras

L'analyse du profil en acides gras a été réalisée au LADA. Quatre échantillons de chair de tilapia (originaire d'Algérie et du CEFRA- Belgique) ont été lyophilisés pendant 48 heures (benchtop, Virtis, USA). L'extraction de la matière grasse totale a été réalisée à l'aide de l'Accelerated Solvent Extraction (ASE 200, Dionex, sunny Vale, CA, USA) (hexane, 125°C, 20 min). 100 mg de graisse ont ensuite été méthylés à l'aide de KOH/MeOH (0,5 N) (3 x 20 min à 70°C) suivi de HCl/MeOH (1/1, v/v) (20 min à 70°C). Les acides gras méthylés ont été séparés par chromatographie gazeuse (Focus GC, ThermoFinnigan, USA) en utilisant une colonne CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm, 0,2 µm) (Varian Inc, USA) et analysés avec un spectromètre de masse (Ion trap, Polaris Q, ThermoFinnigan, USA). Les conditions GC étaient : injecteur chauffé à 250°C, l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1,5 ml/min. Les conditions MS étaient : ligne de transfert 250°C, source 220°C, énergie de collision 35 eV, scanner complet 50 - 650 de 18 à 57,50 min. La température a été programmée : 55°C pendant 1 min, suivi d'une augmentation de 5°C/min jusqu'à 180°C, ensuite, 10°C/min jusqu'à 200°C pendant 15 min, enfin une augmentation de 10°C/min jusqu'à 225°C pendant 12 min. Le temps global d'analyse était de 57,50 min. Les pics ont été identifiés en comparant les chromatogrammes obtenus et leur temps de rétention avec ceux des standards correspondants (Sigma-Aldrich, Belgique). Une courbe de calibration a été réalisée pour chacun des 23 acides gras déterminés. Les concentrations des acides gras ont été déterminées en double (un maximum de variabilité de 10 % entre les résultats dupliqués) et exprimées en pourcentage d'acide gras total.

c. Profil en acides aminés

L'analyse du profil en acides aminés du tilapia a été réalisée au niveau du laboratoire de Chimie Analytique, Unité de Chimie Biologique, de l'Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. La méthode appliquée pour le dosage des acides aminés (libres, totaux et soufrés) a été adaptée à partir de la méthode décrite par la directive européenne n° 98/64/CE (EU, 1998). La méthode appliquée pour le dosage du tryptophane a été adaptée à partir de la méthode décrite par la directive européenne n° 2000/45/CE (EU, 2000).

MATERIELS & METHODES

1) Hydrolyse acide des protéines :

Dans un flacon à bouchon "Schott" de 100 ml, 500 mg de lyophilisat de tilapia (environ 10 mg d'azote) ont été dissous dans 10 ml d'HCl 6 N contenant 0,1 % de phénol. De l'azote a été soufflé sur l'échantillon pendant 1 minute. Le flacon a été chauffé 24 heures dans une étuve à 110°C avant d'être retiré et refroidi dans de la glace pilée. Immédiatement après l'hydrolyse, le flacon a été ouvert avec précaution et il a été refroidi dans de la glace pilée.

Toujours sous glace, 30 ml de tampon citrate à pH 2,2 ont été ajoutés et le pH a été ajusté manuellement entre 0,5 et maximum 1,0 avec du NaOH 7,5 N (de l'ordre de 5 ml) puis automatiquement jusqu'au pH 2,2 avec du NaOH 1 N (solution 1).

Dans un ballon jaugé de 100 ml, 1 ml d'une solution à 50 µM/ml de norleucine dans le tampon citrate à pH 2,2 a été mélangé avec la solution 1. Le mélange a été porté au trait avec le même tampon. Le ballon a été agité puis une partie de la solution a été filtrée (filtre de 0,2 µm) avant d'être injectée dans l'HPLC. Les solutions préparées ont été conservées au frigo.

2) Oxydation performique avant l'hydrolyse acide :

Deux solutions (A et B) ont été préalablement préparées avant de procéder à l'oxydation.

- Solution A : 0,473 g de phénol ont été dissous dans 100 ml d'acide formique à 90 %.
- Solution B : 10 ml H₂O₂ ont été mélangés dans 90 ml de solution A sous hotte dans un Erlen Sovirel en verre contenu dans un bécher en plastique.

La solution B a été laissée à température ambiante pendant 1 heure, puis 15 minutes dans un bain de glace avant d'être mélangé avec la poudre à analyser.

100 à 500 mg de farine de poisson, obtenue par lyophilisation, représentant environ 10 mg d'azote (500 mg pour une farine contenant 2 % d'azote) ont été transférés dans un flacon à bouchon "Schott" de 100 ml puis refroidis dans un bain de glace. 5 ml de la solution B glacée ont été ajoutés sur la poudre glacée au moyen d'une pipette automatique en s'assurant de bien mouiller toute la poudre (former une pâte et éviter les grumeaux). Le flacon a été toujours maintenu dans la glace dans une chambre froide pendant 16 heures. Ensuite, le flacon étant toujours dans l'eau glacée (renouvellement éventuel) a été transféré sous hotte et 0,84 g de métabisulfite de soude ont été additionnés.

10 ml d'HCl 6 N avec phénol ont été lentement ajoutés pour éviter une mousse trop importante avant la fermeture du flacon. Endéans la 1^{ère} heure de chauffage à 120 °C, les bouchons n'ont pas été vissés pour éviter les risques d'explosion. Après la première heure, les flacons ont été fermés et chauffés à 120 °C pendant 23 heures.

MATERIELS & METHODES

3) Dosage du tryptophane après hydrolyse alcaline des protéines :

☀ Préparation des solutions

- Tryptophane (T_{Trp}) 2,5 μ M/ml : à préparer quotidiennement (se dégrade rapidement !).

$PM_{Trp} = 204,23$ soit 51,06 mg Trp / 100 ml de tampon pour Stein et Moore à pH 4,25.

- Etalon d' α -méthyl tryptophane 2,5 μ M/ml : $PM_{\alpha\text{-méthyl tryptophane}} = 218,26$ soit 54,57 mg α -méthyl tryptophane / 100 ml de tampon pour Stein et Moore à pH 4,25.
- Solution d'acétate de soude à pH 4,25 : diluer 2 fois de l'acide acétique glacial et l'amener à pH 4,25 avec de la soude 7,5 N.

☀ Hydrolyse alcaline

Dans un flacon Schott de 100 ml, une quantité correspondant à 10 mg d'azote (particules $\leq 0,5$ mm) a été homogénéisée par rotation avec 8,4 g de $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$. Ensuite, 8 ml d'eau ont été additionnés en s'assurant que tout le mélange a été mouillé. Les parois du flacon ont été rincées avec 4 ml supplémentaires d'eau et le flacon a été soniqué pendant 1 minute à l'ultrason. De l'azote a été copieusement barboté pour éliminer l'air résiduel dans le flacon et le bouchon avant de le fermer. L'hydrolyse a été réalisée par chauffage à 110°C pendant 20 heures. Ensuite, le flacon a été refroidi dans de la glace pilée et 1 ml de solution d' α -méthyle-tryptophane a été ajouté. Par la suite tout en agitant sur un bain de glace, 15 ml de solution d'acétate de Na refroidie ont été doucement ajoutés. Enfin, une partie a été filtrée à travers un filtre 0,2 μ m avant l'injection dans l'HPLC.

☀ Les paramètres de la séparation HPLC:

La colonne chromatographique utilisée pour l'analyse des amines biogènes a été une Vydac C18 : 250 mm x 4,6 mm. Elle a été chauffée à 45°C. Le débit d'injection a été de l'ordre d'1 ml/min et le volume injecté a été de 25 μ l. La phase mobile a été composée de solvant tampon A (acétate / triéthylamine à pH 4,5) et solvant B (méthanol). Le tampon a été préparé avec d'acétate de soude 0,07 M ($PM=82,03$), soit 5,74 g/litre + 0,25 ml de triéthylamine et a été ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial. 950 ml de ce mélange ont été ajoutés à 50 ml de méthanol.

2.1.3. Etablissement du diagramme de production

Le diagramme de production de tilapia "*O. niloticus*" a été établi et vérifié sur site (le schéma sera présenté dans la partie des résultats). Toutes les étapes ont été énumérées depuis la reproduction jusqu'à la commercialisation. Tous les intrants ont été pris en compte et marqués sur l'étape correspondante. Dans la phase *Ante mortem* (élevage), le tilapia passe par trois stades évolutifs :

MATERIELS & METHODES

- ◆ Les œufs fécondés issus de la reproduction naturelle ou de l'insémination artificielle sont incubés dans des bouteilles de Zoug au sein des écloséries en moyenne 10 jours avant éclosion,
- ◆ Les larves écloses sont maintenues dans des petits bassins pendant la phase d'alevinage,
- ◆ Les juvéniles âgés d'un mois en moyenne sont élevés dans des étangs de grossissement jusqu'au 6^{ème} mois post éclosion.

Durant ces stades, l'eau et l'aliment sont des éléments vitaux pour la survie des poissons. Les antibiotiques sont utilisés à titre curatif ou préventif dans l'élevage du tilapia.

L'hormone anabolisante "17 α -méthyle testostérone" est utilisée pour inverser sexuellement les alevins de tilapia en individus mâles.

Enfin, les poissons sont pêchés vivants et transférés dans l'atelier de conditionnement.

A partir de cette étape, nous rentrons dans la phase *Post mortem*, le poisson sera conditionné dans des caisses contenant de la glace pilée et transporté jusqu'aux points de vente. Au niveau de ces marchés, le mode et les conditions d'étalage détermineront les délais de fraîcheur du poisson vendu. De même au niveau des foyers des consommateurs, le mode et la durée de conservation limiteront la fraîcheur et la qualité du poisson acheté.

2.2. Les 07 Principes du système HACCP

2.2.1. *Analyse des dangers (principe 1)*

Quatre sous-étapes successives ont été appliquées afin d'analyser les dangers :

- a) Identification des éventuels dangers d'ordre chimiques, microbiologiques ou physiques qui sont liés à une étape, une méthode ou en relation avec les intrants (à partir du diagramme de production).
- b) Recherche des causes (sources) des différents dangers en appliquant la méthode des "**5M**" : **M**atière première, **M**atériel, **M**ilieu, **M**éthode de travail et surtout la **M**ain d'œuvre.
- c) Identification des mesures préventives : pour chaque danger inventorié une mesure adéquate de contrôle sera proposée afin de l'éliminer ou de le réduire à un niveau acceptable. Ces mesures peuvent être d'une part, des procédures générales de bonnes pratiques aquacoles (BPA) (Ex. formation du personnel) ou d'hygiène (BPH) (Ex. filtration de l'eau), ou d'autre part, des mesures de maîtrise spécifiques (telle que la conservation des poissons sous glace 0°C) ou des mécanismes de contrôle (tels que par exemple le dépistage des résidus d'antibiotiques).

MATERIELS & METHODES

d) Pour chaque danger identifié, nous avons procédé à une **évaluation du risque**. Pour cela il faut tenir compte de la **fréquence** ou la **probabilité** avec laquelle le danger peut apparaître ainsi que la **gravité** pour la santé des suites des dangers s'ils se manifestent et le degré de l'effet néfaste sur la santé (analyse des dangers quantifiée).

Le Risque = Fréquence x Gravité

Cela permet d'**hiérarchiser** les dangers en mineurs, acceptables et majeurs et de décider lesquels sont les plus pertinents.

Les données relatives à la fréquence, à la gravité et au risque ont été collectées à partir des informations scientifiques publiées (articles scientifiques, guides de contrôle de qualités, enquêtes épidémiologiques ...).

Dans le cadre de notre travail, pour la classification des niveaux de la fréquence et de la gravité, nous avons opté pour la procédure NTO (Pays- Bas) qui est détaillée dans le "Guide d'autocontrôle pour le secteur du poisson" (AFSCA, 2011).

L'aspect "significatif" d'un risque est déterminé par :

4) la **gravité** des conséquences si le consommateur est exposé à danger. Le concept de gravité est scindé en trois niveaux :

✓ grand: conséquences fatales, maladie grave, blessures irréversibles survenant immédiatement et à plus long terme.

✓ modéré: blessures substantielles et/ou maladie.

✓ petit : blessures minimales et/ou maladie avec symptômes légers ou nuls.

5) la **probabilité** (fréquence) d'apparition de la contamination dans le produit final, au moment de la consommation, en présageant que les mesures de contrôle ne sont pas présentes ou ont échoué. La probabilité est basée sur des mesures, observations ou attentes, en fonction de la situation spécifique de la ferme aquacole et se divise en trois niveaux :

✓ petit : pratiquement impossible ou improbable (théoriquement).

✓ modéré : peut apparaître, a déjà été signalé (indications).

✓ grand : apparaît de manière répétée.

2.2.2. Détermination des Points critiques de Contrôle (PCC) (Principe 2)

Les points critiques de contrôle (PCC) ont été déterminés en appliquant l'arbre de décision établi par le Codex Alimentarius 1997 (Figure 11) sur les dangers majeurs préalablement identifiés dans l'étape précédente (analyse des dangers).

MATERIELS & METHODES

2.2.3. Maitrise des PCC

Afin de maîtriser les PCC, quatre étapes successives ont été réalisées :

- a) Fixation des limites critiques pour chaque PCC identifié (Principe 3) : pour se faire, nous avons validé expérimentalement des valeurs seuils numériques à ne pas dépasser pour différents paramètres chimiques et microbiologiques (résidus d'antibiotiques, résidus de la MT, amines biogènes, ABVT et TMA, taux des TBARS et les critères microbiologiques) qui reflètent les dangers identifiés. Ces valeurs permettent de séparer **l'acceptable du non-acceptable** (produit sûr / produit dangereux). Par exemple, pour surveiller le phénomène d'oxydation lipidique lors de la commercialisation, nous avons fixé une valeur seuil pour les TBARS (produits secondaires de l'oxydation lipidique) à 0,85 mg MDA kg⁻¹.
- b) Etablir un système de surveillance des CCP (Principe 4) : les différentes méthodes analytiques développées dans le cadre de ce travail ont été proposées comme des procédures de surveillances de quelques PCC. Par exemple, la technique du screening microbiologique permettra la surveillance régulière des résidus de tétracyclines et de fluoroquinolones de chaque lot produit. Le contrôle de la température et l'analyse sensorielle permettront de surveiller l'altération bactérienne et la production des amines biogènes chez le tilapia lors de son transport et sa commercialisation.
- c) Etablir un plan d'actions correctives : des actions correctives adéquates ont été adaptées en fonction du danger perçu. Par exemple, si des résidus d'antibiotiques persistent dans la chair du tilapia, les délais d'attente seront prolongés de quelques jours supplémentaires. Si la température est élevée (> à 5°C) il faudra la baisser en ajoutant de la glace ou maintenir la chaîne du froid. Si les limites critiques sont largement dépassées, il faudra saisir le lot.
- d) Vérifier le système HACCP: afin de vérifier la conformité et l'efficacité du plan HACCP opérationnel, nous pouvons recourir aux analyses de laboratoire basées sur les différentes techniques de confirmation (chromatographiques) développées dans le cadre de cette étude. Par exemple, la nouvelle méthode HPTLC permettra de contrôler les six amines biogènes d'intérêt et la méthode de confirmation LC/UV/MS permettra de quantifier les résidus des fluoroquinolones chez le poisson. L'étalonnage des thermomètres utilisés lors des prises de température permettra de s'assurer qu'ils donnent les bonnes valeurs. .

NB/ La démarche de l'analyse des dangers, de la détermination et de la maîtrise des PCC sera démontrée à la fin de la partie des "Résultats" au sein de tableaux de synthèse des résultats obtenus.

II. EVALUATION DES DANGERS MAJEURS DE LA PHASE ANTE MORTEM

Dans la phase *ante mortem*, nous avons évalué les dangers liées à l'utilisation de médicaments vétérinaires (antibiotiques et 17 α -méthyle testostérone) ainsi que la qualité microbiologiques et chimiques des eaux et des aliments distribués en élevage.

1. *Méthode de détermination des résidus d'antibiotiques :*

Une nouvelle stratégie analytique a été élaborée pour le screening microbiologique des résidus de deux familles d'antibiotiques (tétracyclines et les fluoroquinolones) suivie de la confirmation et de la quantification chromatographique (HPLC-UV) spécifique aux résidus d'acide oxolinique. Les analyses ont été réalisées au sein du Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (LADA) du Département des sciences des denrees alimentaires de la Faculté de médecine vétérinaire (Université de Liège - Ulg).

Les échantillons contrôlés au sein de cette étude, sont issus à partir d'une expérience de contamination des tilapias par de l'acide oxolinique et à partir d'individus de tilapias commercialisés en Algérie.

1.1. Expérience de contamination du tilapia par l'acide oxolinique

L'expérience a été réalisée en duplicata sur des tilapias mâles de 85,81 g \pm 4,24 g, appartenant à la même population d'origine, nés et élevés à la ferme aquacole "Fat-Steppes". Au laboratoire d'Aquaculture et Bioremediation (*AQUABIOR*) du département de Biotechnologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV), à l'Université d'Oran1 (Algérie), **330** tilapias ont été pesés et divisés dans quatre tanks cylindriques d'un mètre cube (1000 L) et répartis en deux lots; le premier correspondant à deux tanks de tilapias traités et le second à deux tanks de témoins. Les tilapias ont été acclimatés une semaine avant le début de l'expérimentation, dans des conditions se rapprochant autant que possible de celles rencontrées réellement en élevage aquacole. Le tank a été muni d'un équipement adéquat qui conditionne l'expérience (Figure 15) : thermoplongeur, filtres à eau et un oxygénateur. Des paramètres physicochimiques ont été contrôlés et mesurés quotidiennement. La température de l'eau a été stabilisée entre 29°C et 30°C, l'oxygène dissous entre 5 et 10 ppm et le pH à 7,6. L'entretien quotidien des tanks par siphonage, le renouvellement d'un tiers d'eau du tank et le rinçage des filtres à eau ont été réalisés chaque matin avant le nourrissage des poissons. Le dosage chimique de l'ammoniac, des nitrites et des nitrates a été réalisé tous les deux jours. La photopériode était naturelle et correspondait à 15 h d'éclairage et 9 h d'obscurité en moyenne. Les poissons des quatre tanks ont été mis à jeun deux jours avant le début de l'administration de l'aliment médicamenteux.

MATERIELS & METHODES



Figure 15 : Tank équipé utilisé pour l'expérience de contamination du tilapia (*Oreochromis niloticus*) avec de l'acide oxolinique.

1.1.1. Préparation et administration de l'antibiotique

a. L'aliment :

Un aliment adapté aux tilapias a été formulé par une méthode traditionnelle au sein du laboratoire "AQUABIOR". Un kilogramme d'aliment était composé de 540 g farine de saurels (issues de la pêche), de 176 g de farine de maïs, 168 g de farine de soja, 112 g de farine de blé, 2 g d'Agar, 2 g d'un complexe vitaminé (Premix) et 1,5 % d'huile de foie de morue. Le format du granulé a été ajusté à la taille et à l'âge du poisson étudié.

b. Préparation de l'aliment médicamenteux :

Le protocole élaboré par le laboratoire de toxicologie de l'Ecole Vétérinaire de Nantes-France (Guichard, 2000) et les techniques proposées dans la littérature (Tyrpenou et *al.*, 2003 ; Samuelsen & Bergh, 2004) ont servi de base pour la réalisation de l'incorporation de l'antibiotique à l'aliment.

L'aliment médicamenteux utilisé pour cette étude a été préparé par enrobage de l'antibiotique sur l'aliment formulé à l'aide de l'huile de foie de morue. Le médicament utilisé est de l'acide oxolinique à usage vétérinaire "Oxomid 20[®]" (VIRBAC, France) qui est un pré-mélange à 20 %. Les granulés ont d'abord été mélangés avec la poudre d'Oxomid de manière à obtenir une répartition homogène, à une concentration de 2,4 g d'acide oxolinique par kg d'aliment médicamenteux (soit 12 g d'Oxomid pour 988 g d'aliment). Ensuite, une proportion de 1,5 % d'huile du foie de morue a été ajoutée. Le mélange a été réalisé une semaine avant le début de l'expérimentation et stocké à 4°C à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Trois échantillons de l'aliment médicamenteux ont été prélevés avant, pendant et après l'expérience. La stabilité et l'homogénéité de l'antibiotique dans l'aliment ont été vérifiées par

MATERIELS & METHODES

dosage chromatographique (HPLC/UV) (même méthode que pour l'analyse de l'OXO dans la chair du tilapia).

c. Administration du médicament :

Chaque jour, durant les six jours consécutifs du traitement, la quantité de granulés à administrer a été calculée en fonction de la biomasse des poissons. Sachant que la biomasse représente la masse totale de l'ensemble des poissons occupant l'aquarium, la valeur moyenne de la biomasse a été calculée selon la formule suivante :

Poids moyen * l'effectif de poissons présents dans l'aquarium.

Le nourrissage des tilapias a été réalisé par distribution manuelle de l'aliment, à raison de deux prises journalières, afin de simuler les pratiques réelles d'élevage. Pour correspondre à la dose thérapeutique préconisée de 12 mg / Kg de poisson / jour, une proportion de 0,50 % de la biomasse a été distribuée.

1.1.2. Prélèvements

Des prélèvements de tilapia (*O. niloticus*) ont été effectués à seize temps différents : 3h, 6h, 8h, 10h, 13h, 24h et 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 et 14 jours après la première prise médicamenteuse dans le premier lot. Trois variantes de prélèvement ont été réalisées dans le deuxième lot : prélèvement après 12h, 10 jours et 13 jours après la première prise médicamenteuse en remplacement des points 10h, 13h et 14 jours. Cinq poissons (n = 5) ont été prélevés aléatoirement pour chaque point de cinétique.

a. Prélèvement sanguin :

Les poissons prélevés ont été anesthésiés avec du 2-Phénoxyéthanol (122.99.6) fourni par Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA), puis déposés sur une table recouverte d'une serviette humide. La ponction de sang a été réalisée au niveau du sinus veineux caudal avec une seringue à tuberculine. Le sang a été directement transvasé dans un tube. Par la suite le sérum a été recueilli après centrifugation de 10 min à 3000 rpm. Le sérum collecté a été conservé à -18°C jusqu'au moment de l'analyse chromatographique.

b. Prélèvement de la chair :

Une fois le sang prélevé, les poissons ont été euthanasiés par une dose létale avec le même anesthésique. Les muscles dorsaux recouverts de peau (5 g au minimum de muscle et peau en proportions naturelles) ont été prélevés en utilisant un bistouri. Les échantillons ont été conservés à -18°C jusqu'au moment de l'analyse.

MATERIELS & METHODES

1.2. Screening microbiologique pour la détection des résidus d'antibiotiques dans la chair du tilapia

1.2.1. Réactifs

Les standards d'antibiotiques ont été fournis par Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA); Fluoroquinolones : acide oxolinique (75905), ciprofloxacine (17859), enrofloxacin (33699) et fluméquine (F7016). Les Tétracyclines: chlortétracycline (C4881), doxycycline (D9891), tétracycline (T7660) et oxytétracycline (O5875). La suspension de spores de *Bacillus subtilis* (Strain BGA contenant 10^7 spore/ml⁻¹.10649- ampoule de 2 ml), le milieu de culture Test Agar pH 6 (1.10663) et l'hydroxyde de sodium ont été fournis par Merck (Darmstadt, Germany). L'acétonitrile et l'hydroxyde d'ammonium ont été fournis par Acros Organics (New Jersey, USA). L'acétone et le méthanol ont été fournis respectivement par Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands) et Prolabo (Pennsylvanie, USA). Les disques vierges de 12,7 mm de diamètre (0905A00005) ont été fournis par Fiers (Belgique).

1.2.2. Préparation des solutions

- Solution d'antibiotique de stock :

Pour préparer une solution de stock à une concentration de 1 mg/ml, les tétracyclines ont été dissoutes dans du méthanol et les fluoroquinolones dans du méthanol additionné de NH₄OH 30 % et de NaOH 10 N pour faciliter leur dissolution.

- Solution d'antibiotique intermédiaire et finale :

La solution intermédiaire à 20 µg/ml a été obtenue en diluant 50 fois la solution d'antibiotique de stock (1 mg/ml) dans du méthanol. Cette dernière a été diluée 4 fois dans du méthanol pour préparer une solution de dopage à 5 µg/ml.

Les solutions de chlortétracycline et de tétracycline ont été conservées au congélateur (- 20C°) et les autres solutions au réfrigérateur (4C°).

1.2.3. Préparation des milieux de culture microbiologique

Le milieu de culture pH 6 pour le screening a été préparé à partir d'un mélange du bouillon de culture pH 6 (200 ml), 2,66 ml de solution de glucose à 6 % et de 200 µl de la suspension de spores de *Bacillus subtilis*. 8 ml du bouillon ont été coulés dans des boîtes de Pétri stériles conservées maximum une semaine au réfrigérateur (4C°).

NB/ Pour chaque nouvelle préparation de milieu de culture à pH 6, un contrôle positif et un contrôle négatif ont été effectués afin de vérifier la validité des boîtes de gélose.

MATERIELS & METHODES

Pour le contrôle positif, deux antibiotiques représentant les deux familles d'intérêt (fluoroquinolones et tétracyclines) ont été testés : l'acide oxolinique et l'oxytétracycline.

50 µl des solutions standards intermédiaires (20 µg/ml) ont été inoculés sur chacun des deux disques de cellulose placés dans la boîte de Pétri.

Pour le contrôle négatif, 50 µl de méthanol ont été déposés sur chaque disque. Sur le second, sont ajoutés 20 µl de NaOH à 1 % et les boîtes sont incubées pendant 18h à 31°C.

1.2.4. Extraction des résidus d'antibiotique

Le protocole de Dang *et al.* (2010) a été adapté pour réaliser le screening microbiologique avec une modification qui a été validée pour huit antibiotiques (Fluoroquinolones : acide oxolinique, ciprofloxacine, enrofloxacin et fluméquine & les Tétracyclines : chlortétracycline, doxycycline, tétracycline et oxytétracycline) chez le tilapia. La chair du poisson étant la seule matrice non exploitée dans les travaux de Dang *et al.* (2010, 2011).

Pour la validation, vingt échantillons "blancs" de tilapias non contaminés, provenant du Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (CEFRA) de Tihange-Université de Liège-Belgique, ont été fortifiés avec chaque antibiotique d'intérêt à différentes concentrations.

Dans un tube à centrifugation de 15 ml, 4 g d'échantillon (chair et peau de poisson) ont été mélangés avec 5 ml d'un mélange acétonitrile/acétone 70/30 (v/v). Après agitation 15 mn dans un agitateur rotatif et centrifugation 15 mn à 3000 rpm à 20°C, la phase supérieure a été transvasée dans un nouveau tube. L'extrait a été évaporé à sec sous courant d'azote à 40°C puis reconstitué dans 200 µl de méthanol.

NB/ Le volume de méthanol a été réduit de 50 µl par rapport au protocole de base (Dang *et al.*, 2010) afin de concentrer l'extrait et diminuer la limite de détection de la méthode.

Le mélange a été vortexé, centrifugé 10 mn à 3000 rpm à 20°C. Enfin, 50 µl de la phase supérieure ont été inoculés sur chacun des deux disques en cellulose qu'on a déposé préalablement sur la gélose. Un volume supplémentaire de 20 µl NaOH à 1 % a été ajouté sur le deuxième disque.

1.2.5. Incubation

Les boîtes de Pétri ont été laissées 1h à température ambiante avant de les mettre dans l'incubateur pendant 18h à 30°C.

MATERIELS & METHODES

1.2.6. Lecture

La zone d'inhibition produite est mesurée avec un pied à coulisse. Un résultat est considéré comme positif (présence d'antibiotique) à partir d'une valeur $\geq 1,5$ mm de la largeur de la zone d'inhibition, au niveau d'au moins un des deux disques.

1.3. Evaluation des paramètres de performance du screening microbiologique

Les paramètres de performance de la méthode ont été mesurés selon les recommandations de la décision 2002/675/CE (EC, 2002) ainsi que le Guide pour la validation des méthodes de dépistage (Gaudin & Sanders, 2005).

Quatre paramètres ont été calculés pour les huit antibiotiques d'intérêt. Pour ce faire, des séries de 20 échantillons blancs fortifiés avec des concentrations décroissantes à partir de la LMR, ainsi que 20 échantillons blancs témoins ont été analysés.

✚ Le premier paramètre est la capacité de détection ($CC\beta$ / Concentration Critique β) : plus petite teneur en substance pouvant être détectée, identifiée et/ ou quantifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β (2002/657/CE).

Cette capacité de détection correspond à une concentration où 19 échantillons au moins parmi les 20 testés donnent un résultat positif (largeur de zone d'inhibition $\geq 1,5$ mm) ce qui assure un risque β (risque de faux négatif) ≤ 5 %.

✚ Les trois autres paramètres validés pour ce test microbiologique sont la sensibilité, la spécificité et l'exactitude, définis respectivement comme suit :

- Sensibilité : pourcentage d'échantillons détectés comme suspects d'être non conformes (positifs) dans une population d'échantillons réellement non conformes.
- Spécificité : pourcentage d'échantillons détectés comme conformes (négatifs) dans une population d'échantillons réellement conformes.
- Exactitude : pourcentage de décisions correctes (échantillon conforme ou suspect d'être non conforme) donné par la méthode de screening.

Les 20 échantillons blancs sont considérés comme vrais négatifs (vrais conformes) et les 20 échantillons fortifiés sont considérés comme vrais positifs (ou vrais non conformes).

Pour réaliser les calculs, différents éléments ont été présentés dans le Tableau IV et trois formules ont été utilisées (Gaudin & Sanders, 2005) :

✚ Sensibilité (%) = $(N^+ / VP) \times 100$ %.

✚ Spécificité (%) = $(N^- / VN) \times 100$ %.

✚ Exactitude (%) = $[N / (VP + VN)] \times 100$ % (N : $N^+ + N^-$).

MATERIELS & METHODES

Tableau IV : Elément permettant de déterminer l'exactitude, la spécificité et la sensibilité de la méthode microbiologique (Gaudin & Sanders, 2005).

Résultat du test	Echantillon réellement positifs (VP) (Echantillons supplémentés)	Echantillon réellement négatifs (VN) (Blancs)
Positif	N ⁺ (Vrai Positif)	FP (Faux Positif)
Négatif	FN (Faux Négatif)	N ⁻ (Vrai Négatif)

VP : nombre d'échantillons supplémentés analysés.

VN : nombre d'échantillons blancs analysés.

N⁺ : nombre d'échantillons détectés comme positifs, parmi les N⁺.

N⁻ : nombre d'échantillons détectés comme négatifs, parmi les N⁻.

FN : nombre d'échantillons détectés comme positifs, parmi les N⁻.

VN : nombre d'échantillons détectés comme négatifs, parmi les N⁺.

1.4. Analyse de confirmation par chromatographie LC-UV-MS des résidus d'acide oxolinique dans la chair de tilapia

Le protocole de Danyi *et al.* (2011) a servi de base pour cette analyse. Une optimisation a été réalisée pour la détection UV et MS de l'acide oxolinique dans la chair du tilapia.

1.4.1. Réactifs et Matériels

En plus des réactifs en commun avec le protocole du screening, la loméfloxacin (98079-51-7) et le cincophen (2-phenyl-4quinoline carboxylic /132-60-5) ont été fournis par Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA), l'acide formique 98 % a été fourni par AcrosOrganics (New Jersey, USA), l'acétate d'ammonium 98 % a été fourni par Merck (Darmstadt, Germany) et l'eau de qualité HPLC a été fournie par BDH (Poole, England).

Des filtres Acrodisc 13 mm avec une membrane de 0,2 µm, des seringues Hamilton de 1 ml, des cartouches SPE (SDB-RPS) et un VacMaster ont été utilisés lors de la purification.

1.4.2. Préparation des solutions

- Solutions d'acide oxolinique et de standards internes :

La solution de travail d'OXO est une dilution 100 fois de la solution stock (1 mg/ml) dans du méthanol.

- Pour la courbe de calibration, préparée en matrice, dix solutions intermédiaires ont été préparées pour obtenir des concentrations finales de 0 à 10 x LMR (Tableau V).

MATERIELS & METHODES

Tableau V : Gamme de concentrations en acide oxolinique utilisée pour la courbe de calibration (réalisée en matrice).

CCx	Concentration	
	µg/kg	
CC1	0	0
CC2	LMR/20	5
CC3	LMR/4	25
CC4	LMR/2	50
CC5	LMR	100
CC6	1,5 x LMR	150
CC7	2 x LMR	200
CC8	5 x LMR	500
CC9	7,5 x LMR	750
CC10	10 x LMR	1000

LMR de l'acide oxolinique = 100 µg/kg dans la chair du poisson (Règlement (EU) n°37/2010)

- Deux standards internes ont été choisis pour cette analyse : le cincophen (pour la détection UV) et la loméfloxacin (pour la détection MS). Ces standards ont été préparés au sein d'un "pool" contenant 30 µl de la solution stock (1 mg/ml) de chacun des deux composés additionnés de 9,94 ml d'acide formique à pH 2,5.
- Solutions d'extraction :
 - ✚ Solution d'hydroxyde d'ammonium 1 M : dans une fiole jaugée d'un litre, 35 ml d'hydroxyde d'ammonium 28-30 % ont été dilués avec de l'eau.
 - ✚ Solution d'acétate d'ammonium tampon 5 mM (pH=4) : 385 mg d'acétate d'ammonium ont été solubilisés dans 950 ml d'eau. Le pH a été ajusté à 4 avec de l'acide acétique 96 % puis le volume a été complété avec de l'eau jusqu'à 1 litre.
 - ✚ Solution d'élution de la colonne SPE: un mélange méthanol / hydroxyde d'ammonium 1 M (75:25, v/v) a été préparé.
 - ✚ Solution d'acide formique (pH 2,5) : de l'acide formique 98 % a été ajouté à 1 L d'eau (grade HPLC) jusqu'au pH 2,5 en contrôlant avec un pH-mètre.

1.4.3. Extraction

Pour les échantillons inconnus (issus de l'expérience de contamination avec de l'acide oxolinique et ceux issus d'un élevage algérien de tilapia), 0,5 g ± 0,05 g d'échantillon homogénéisé de chair de poisson ont été dopés avec 100 µl du pool de standards internes dans des tubes à centrifugation de 50 ml et ont été maintenus au repos pendant 15 mn. Pour les points de la courbe de calibration (CCx) 1 g ± 0,05 g de chair a été pesé à partir des blancs (tilapias non contaminés obtenus par le CEFRA). 100 µl du pool de standards internes et 100 µl

MATERIELS & METHODES

de la solution intermédiaire d'acide oxolinique correspondante à chaque point (CC1- CC10) ont été ajoutés (Tableau V).

10 ml d'acétonitrile ont été ajoutés dans le tube, le mélange a été vortexé, agité 15 mn à l'agitateur rotatif et centrifugé 10 min à 4000 rpm à température ambiante. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Falcon et 3 ml d'hexane ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été vortexé 2 min et centrifugé 5 min à 4000 rpm à température ambiante. La phase inférieure a été récupérée et a été évaporée sous courant d'azote à 37C°. Le résidu sec a été reconstitué dans 2 ml d'acétate d'ammonium tampon (5 mM, pH 4). Le mélange a été vortexé 15 secondes puis soniqué 15 mn.

1.4.4. Purification

Après conditionnement de la colonne SPE (SDB-RPS) en utilisant successivement 2x 1 ml de méthanol, 2x 1 ml d'eau et 2x 1 ml du tampon d'acétate d'ammonium, l'extrait a été transféré sur la colonne et le tube a été rincé avec 1 ml du tampon d'acétate d'ammonium puis versé sur la colonne.

La colonne a ensuite été séchée par centrifugation 5 mn à 4000 rpm. L'analyte a été élué avec 4 ml du mélange méthanol + hydroxyde d'ammonium 1 M (75:25, v/v). L'éluat a été évaporé sous courant d'azote à 37C° puis le résidu sec a été reconstitué dans 300 µl eau/acide formique (pH 2,5), filtré à travers un filtre Acrodisc® (0,20 µm) et enfin chargé dans des vials avec inserts qui ont été scellés et conservés à 4°C jusqu'au moment de l'injection.

1.4.5. Injection

L'analyse a été réalisée sur une chaîne HPLC de type Spectra System P4000, couplée à un injecteur automatique AS3000 et à des détecteurs de type barrettes de diodes (UV6000LP) et spectromètre de masse (LCQDeca, ThermoFinnigan). Le logiciel servant à piloter les appareils et à quantifier les résultats est XCalibur. Le volume d'injection est de 20 µl sur une colonne de type Varian Chromsep SS 150 * 2 mm (L*ID) Polaris 3 C18-A placée dans un four à 40°C. La longueur d'onde de la détection UV est de 260 nm. Le run time est de 20 min et le flux est de 0,4 ml/ min. Le programme du gradient d'éluion utilisé est repris au Tableau VI. Quant aux paramètres de détection MS optimisés, ils sont indiqués dans le tableau VII.

MATERIELS & METHODES

Tableau VI : Programme du gradient d'élution de l'acide oxolinique (HPLC).

Temps (min)	Solution d'acide formique pH 2,5 (%)	Acétonitrile (%)
0,00	90	10
1,00	90	10
12,00	20	80
14,00	0	100
14,20	90	10
20,00	90	10

Tableau VII : Paramètres optimisés de la détection par spectrométrie de masse (MS).

Machine	LCQ Deca (Thermo)
Split	0.15 ml/min source / 0.25ml/min waste
Divert valve	0.3 - 3.5min : waste 3.5 – 14min : source 14 – 20min : waste
<i>Source :</i>	
ESI	+
Sheath Gaz	40
Aux. Gaz	30
Spray voltage	6.5 kV
Spray current	µA
Capillary temperature	275°C
Capillary voltage	32 V
Tune Lens offset	55 V
<i>Ion optics :</i>	
Multipole 1 offset	-5 V
Lens voltage	-66 V
Multipole 2 offset	-11 V
Multipole RF amplitude	120 V
Entrance lens	-48 V
Multiplier	-1050 V
MRM	0 à 6.25 min: lomefloxacin: 352@25: 256 + 308 6.25 in 20 min : Ac. Oxolinic: 262@33: 244 + 262

1.4.6. Calcul des résultats

Le logiciel (XCalibur) calcule automatiquement l'équation (régression linéaire) de la courbe dose (concentration en acide oxolinique) – réponse (rapport entre l'aire du pic de l'acide oxolinique et l'aire du pic du standard interne). Le logiciel calcule également automatiquement, à partir des paramètres de la régression linéaire, les concentrations en acide oxolinique dans les échantillons inconnus. L'opérateur vérifie la bonne intégration des pics et que les concentrations calculées pour les échantillons inconnus sont bien dans l'intervalle de travail de la courbe de calibration.

MATERIELS & METHODES

1.5. Evaluation des paramètres de performance de la méthode LC-UV

Pour cette analyse quantitative, plusieurs paramètres ont été évalués en se référant à la décision de la commission européenne 2002/657/CE (EC, 2002).

✚ **Justesse:** elle se définit comme étant l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée. Elle a été évaluée grâce à l'analyse des matrices "blanches" supplémentée en analytes.

Dans le cadre de notre étude, cinq concentrations ont été évaluées (LMR/4, LMR/2, LMR, 1,5x LMR et 2x LMR) en triplicat, sur les deux matrices d'intérêt (chair et sérum).

La formule suivante a été appliquée pour calculer la justesse :

$$\text{Justesse} = \text{Concentration moyenne} * 100 / \text{Niveau de renforcement}$$

Les résultats obtenus doivent se trouver dans un intervalle de -20 % à +10 % de la concentration attendue (décision 2002/657/CE) pour la gamme de concentration dans laquelle se situent les échantillons (≥ 10 ppb).

✚ **Fidélité :** La fidélité est par définition l'étroitesse de l'accord entre des mesures effectuées sur des prises multiples d'un échantillon homogène. Elle exprime le degré de dispersion entre une série de dosages provenant de multiples prises d'essai de l'échantillon dans des conditions expérimentales bien précises. Ce critère est évalué par la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité. Il est exprimé comme la variance, la déviation standard ou le coefficient de variation (RSD) d'une série de mesures.

- La répétabilité, est la mesure de la fidélité d'une méthode d'analyse lorsqu'elle est réalisée par le même opérateur, dans le même laboratoire avec les mêmes équipements et dans un court laps de temps.

- La reproductibilité est la mesure de la fidélité d'une méthode d'analyse quand des variations interviennent dans les conditions de mesure.

Généralement, on évalue la répétabilité d'une méthode en réalisant plusieurs analyses le même jour et la reproductibilité d'une méthode en réalisant les analyses des jours différents.

La répétabilité et la reproductivité sont évaluées sur une série d'échantillons contaminés à différentes concentrations (LMR/2, 1x LMR, et 2x LMR), analysés le même jour, et chaque échantillon est analysé idéalement 6 fois. La fidélité est exprimée par un coefficient de variation (CV ou RSD) :

$$\text{RSD} (\%) = \text{écart type} / \text{moyenne} \times 100$$

La valeur du RSD est fixée à **23 %** pour le CV de reproductibilité et de **15 %** pour le CV de répétabilité (2/3 de la valeur de CV de reproductibilité) pour les concentrations concernées ici (EC, 2002).

MATERIELS & METHODES

✚ **Limite de quantification (LOQ)** : La limite de quantification est définie comme la plus faible quantité d'analyte pouvant être quantifiée dans la matrice avec certitude.

✚ **Limite de détection (LOD)** : elle est définie comme la plus faible quantité d'analyte pouvant être détectée dans la matrice avec certitude.

✚ **Linéarité** : La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une réponse instrumentale ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon. Cette proportionnalité s'exprime au travers d'une expression mathématique définie a priori. Il s'agit donc de vérifier le domaine de linéarité et d'en déduire les caractéristiques de l'étalonnage.

✚ **Spécificité** : Une méthode est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal analytique ne provient que de l'analyte sans interférence avec des éléments de la matrice ou des impuretés.

Le temps de rétention relatif est le rapport entre le temps de rétention (TR) de l'acide oxolinique (OXO) et le TR de son standard interne.

Le temps de rétention relatif (TRR) de l'OXO dans l'échantillon ne doit pas s'écarter du TRR moyen de l'OXO de référence (courbe de calibration) de plus de $\pm 2,5 \%$.

✚ **Sélectivité** : La sélectivité est l'aptitude d'un système analytique à discerner un analyte donné dans un mélange complexe. Ce critère permet de garantir que la réponse analytique n'est pas affectée par d'autres substances.

2. *Méthode du dosage de la 17 α -méthyle testostérone (MT)* :

Pour le monitoring et la quantification des résidus de 17 α -méthyle testostérone à partir des échantillons de chair de tilapia et d'eau d'élevage ont été réalisés au moyen d'un Kit ELISA "METHYLTESTOSTERONE 2 hours", élaboré par le laboratoire d'hormonologie "CER Groupe" (Marloie, Belgique). Le protocole d'extraction des résidus d'hormone à partir de la chair a été légèrement modifié afin d'améliorer le rendement de l'extraction de la méthode. Quant au protocole d'extraction des résidus de l'hormone à partir de l'eau, il a été maintenu tel que décrit dans le kit ELISA pour l'analyse d'échantillons d'urine.

MATERIELS & METHODES

2.1. Expérience du traitement hormonal des juvéniles de tilapias

Le protocole expérimental d'inversion sexuelle des juvéniles de tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) à la 17 α -méthyle testostérone a été appliqué selon le protocole élaboré par le CEFRA. La première phase de fécondation a été réalisée artificiellement. 1600 œufs ont été collectés chez une femelle mature par stripping et mélangés avec la laitance d'un mâle mature dans un récipient. Une fois la fécondation activée en ajoutant de l'eau, les œufs fécondés ont été incubés dans une bouteille de Zoug (1,5 l). La température d'incubation durant l'expérience était de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à la résorption de la vésicule vitelline au 10^{ème} jour. Les larves obtenues (70 %) ont été ensuite pesées, dénombrées et réparties en 4 groupes de 200 individus. Les trois premiers groupes ont constitué le lot traité, ils ont été maintenus en aquariums de 50 l. Le 4^{ème} groupe, lot témoin, a été maintenu dans une jarre cylindroconique de 50 l. Chaque système d'élevage est constitué d'un circuit fermé muni d'un filtre mécanique et biologique (vortex), d'un chauffage avec thermostat (température optimale de croissance 27°C) et d'un renouvellement constant de l'eau. La concentration en oxygène était d'un minimum de 5 ppm. Une ration optimale, de l'aliment hormoné a été distribuée entre le 10^{ème} et le 40^{ème} jour post-fécondation (28 jours de traitement). L'aliment du lot témoin était exempt de l'hormone. Durant ces 28 jours de traitement, la ration a été distribuée manuellement et étalée sur 8 heures (de 8 heure du matin jusqu'à 16 heure de l'après-midi). Elle a été calculée en fonction de la formule de rationnement optimale établie par le CEFRA : $Y = 5,818 x^{-0,233}$; y : étant le poids des poissons en gramme et x : le ratio de biomasse (%).

La température de l'eau et l'oxygène dissous ont été contrôlés quotidiennement avec un oxymètre. Les concentrations d'ammoniac et de nitrites dans l'eau ont été contrôlées deux fois par semaine par spectrophotomètre.

Le traitement hormonal masculinisant a été appliqué par incorporation de l'hormone de synthèse (17 α -méthyle testostérone, *Sigma-Aldrich*, réf. 69240) dans l'alimentation des juvéniles. Afin d'incorporer l'hormone dans l'aliment, 65 mg de MT ont été dissous dans 600 ml d'éthanol absolu et mélangés avec un kilogramme d'aliment. Au total, 1,4 kg d'aliment hormoné ont été distribués durant les 28 jours de traitement correspondant à 91 mg de MT.

Les alevins obtenus suite à l'inversion sexuelle ont subi un grossissement de trois mois. Les poissons ont été maintenus dans des conditions optimales d'élevage (paramètres physico-chimiques et de densité d'élevage). Les alevins ont été nourris automatiquement (distributeurs d'aliment) par trois calibres de granulés dont la granulométrie dépendait de la taille du poisson. La ration distribuée correspondait à 5 % de la biomasse des poissons. Dans le respect de l'éthique animale (Autorisation n° 1123 délivrée par le comité d'éthique de l'utilisation des

MATERIELS & METHODES

animaux à l'université de Liège, Belgique), les alevins sacrifiés pour le sexage et le prélèvement de la chair ont été euthanasiés à la benzocaïne (*Sigma-Aldrich*, réf. E1501) (200 mg l⁻¹ d'eau).

✚ Après 90 jours d'élevage, le sexe phénotypique des animaux a été déterminé par la méthode du squash gonadique (Guerrero & Shelton, 1974) en prélevant une centaine d'individus.

✚ Pour le contrôle des résidus de la 17 α -méthyle testostérone (MT) dans la chair des tilapias, un prélèvement aléatoire (post-traitement) d'un minimum de 5 poissons (n = 5) (en fonction de la taille) par aquarium a été réalisé tous les 15 jours :

j1 (fin du traitement), j 15, j 30, j 45, j 60, j 75 et j 90. Les poissons échantillonnés ont été euthanasiés (benzocaïne), les muscles dorsaux recouverts de peaux (en proportions naturelles) ont été prélevés et conservés au congélateur (-18 °C) jusqu'au moment de l'analyse des résidus par ELISA.

✚ Des échantillons supplémentaires de chair de tilapias issus directement de poissons commercialisés en Algérie ont également été analysés. Ces poissons ont été élevés pendant 5 mois post-traitement hormonal à la MT au niveau de la ferme aquacole Fat-Steppes. Une trentaine de poissons ont été aléatoirement sélectionnés et leurs muscles dorsaux ont été sectionnés et homogénéisés. Chaque dizaine d'échantillons ont formé un seul pool, ainsi trois pools globaux ont été prévus pour l'analyse finale des résidus de la MT (n = 3).

✚ En ce qui concerne l'échantillonnage de l'eau, une douzaine de prélèvements ont été réalisés à partir des deux circuits fermés indépendamment (traité et témoin) une semaine avant le début du traitement hormonal, au 21^{ème} jour et au 27^{ème} durant le traitement. Après l'arrêt du traitement les prélèvements ont été effectués au sein des aquariums (traité et témoin) et même à partir des eaux rejetées.

✚ Afin d'évaluer la stabilité de la MT dans l'aliment médicamenteux, trois échantillons ont été prélevés avant, pendant et après le traitement hormonal.

Tous les échantillons (chair, eau et aliment) ont été conservés à -18 °C jusqu'au moment de l'analyse des résidus de MT par ELISA.

MATERIELS & METHODES

2.2. Monitorage des résidus d'MT par ELISA

2.2.1. *Préparation des solutions*

✚ Solution tampon (TP₁ pour l'analyse de l'eau) : acétate de sodium 50 mM, pH= 4,8 : 4,1 g CH₃COONa dans un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté avec de l'acide acétique 20 %.

✚ Solution tampon (TP₂ pour l'analyse de la chair) : PBS 67 mM, pH= 7,2 : 2,9 g de NaH₂PO₄.H₂O + 8,19 g de Na₂HPO₄.2H₂O dans un litre d'eau distillée.

✚ Solution tampon (TP₃ pour l'analyse de la chair) : PBS 20 mM, pH= 7,2 : 0,87 g de NaH₂PO₄.H₂O + 2,44 g de Na₂HPO₄.2H₂O dans un litre d'eau distillée.

✚ Tampon de dilution (TD) du Kit ELISA, pH= 7,4, dilué 10 fois dans de l'eau distillée.

✚ Tampon de rinçage (TR) du Kit ELISA, dilué 10 fois dans de l'eau distillée.

✚ Méthyle testostérone conjuguée à une enzyme (traceur du Kit ELISA), dilué 100 fois dans le tampon de dilution (TD).

✚ Solution d'anticorps du Kit ELISA, le vial d'anticorps lyophilisé reconstitué dans 6 ml du tampon de dilution (TD).

2.2.2. *Protocole*

a. Eau :

▪ *Extraction*

Dans un tube en verre, 1 ml d'eau a été mélangé avec 6 ml de TP₁ et 16 µl de β glucuronidase/arylsulfatase d'*Helix Pomatia*. La solution a été incubée 3 heures à 55°C pour permettre l'hydrolyse des métabolites de la méthyle testostérone.

▪ *Purification*

L'eau ayant subi l'étape d'hydrolyse a été purifiée à travers une colonne SPE (Solid Phase Extraction C₁₈, 1 ml, 100 mg par colonne, JT Baker réf. nr 7020-01) avec un débit d'une goutte par seconde. La colonne a été conditionnée avec 2 ml de méthanol (100 %) et équilibrée avec 2 ml de la solution du tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH= 4,8 (TP₁). L'échantillon hydrolysé a été chargé (7 ml) sur la colonne SPE conditionnée, puis celle-ci a été lavée avec 2 ml du TP₁ et 3 ml d'une solution de méthanol/eau distillée (40/60) (v/v). Les résidus ont été élués (15 gouttes / min) avec 1 ml d'une solution méthanol/eau distillée (80/20) (v/v).

L'éluat a été évaporé à sec sous courant d'azote et le résidu a été reconstitué dans 100 µl d'éthanol et 900 µl du tampon de dilution du kit ELISA. 50 µl de chaque échantillon extrait ont été analysés en double dans le test ELISA.

MATERIELS & METHODES

b. CHAIR :

▪ *Extraction*

2 g de tissus ont été homogénéisés à l'Ultra-Turrax avec 8 g du tampon PBS (TP₂) 67 mM, pH=7,2. 5 ml de tert-butyl-méthyle éther (TBM éther) ont été ajoutés dans le tube Falcon (15 ml) contenant la moitié du broyat (5 g). Le mélange a été vortexé, agité 30 mn à l'agitateur rotatif et centrifugé 10 min à 4000 rpm à 20°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 10 ml et le culot a été réextrait une seconde fois avec 5 ml de TBM éther et recentrifugé. Les surnageants ont été mélangés et évaporés sous courant d'azote à 40°C. Le résidu sec a été reconstitué dans 1 ml de solution méthanol / eau distillée (60/40) (v/v), puis dilué dans 2 ml du tampon PBS 20 mM, pH= 7,2 (TP₃).

▪ *Purification*

L'extrait a été purifié à travers une colonne SPE (Solid Phase Extraction C₁₈, 1 ml, 100 mg par colonne, JT Baker ref. nr 7020-01) avec un débit d'une goutte par seconde.

La colonne a été conditionnée avec 3 ml de méthanol (100 %) et équilibrée avec 2 ml de la solution du tampon (TP₃). L'extrait a été chargé (3 ml) sur la colonne SPE conditionnée, puis celle-ci a été lavée avec 2 ml d'une solution méthanol/eau distillée (40/60) (v/v). La colonne a été centrifugée pour extraire les dernières traces de liquide, ensuite, les résidus ont été élués (15 gouttes / min) avec 1 ml de méthanol (100 %) (v/v).

L'éluat a été évaporé à sec sous courant d'azote et le résidu a été reconstitué dans 100 µl d'éthanol et 900 µl du tampon de dilution du kit ELISA. 50 µl de chaque échantillon extrait ont été analysés en double dans le test ELISA.

NB/ trois échantillons d'aliment médicamenteux (matrice solide) ont été analysés de la même manière que la chair du tilapia.

2.2.3. *Procédure du test ELISA*

Un nombre adéquat de puits a été préparé selon le nombre d'échantillons à analyser et les points de la courbe d'étalonnage en double. Dans les deux premiers puits (A₁, A₂) ont été ajoutés 150 µl du tampon de dilution (TD) qui représente le NSB (Non Specific Binding). Ensuite, 50 µl de chaque point de la courbe de calibration (7 points) ont été ajoutés en commençant par le blanc (0 ng/ml) suivi d'un ordre descendant des concentrations allant de 2 ng/ml à 0,05 ng/ml. 50 µl de chaque extrait d'échantillon ont été ajoutés dans les puits suivants. 100 µl de l'enzyme conjuguée à la MT (traceur) ont été ajoutés à tous les puits, suivi de l'addition de 100 µl de la solution d'anticorps anti-méthyle testostérone, excepté pour les puits "non spécifique" (NSB). La plaque a été couverte puis agitée pendant 1 minute avant une

MATERIELS & METHODES

incubation à +4°C pendant 2 heures. À la fin de l'incubation, les puits ont été vidés et rincés 3 fois avec le tampon de rinçage (TR). Après séchage, 150 µl de la solution peroxide/TMB, prête à l'emploi, ont été additionnés à chaque puits. La plaque a été incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, 50 µl de la solution d'arrêt de la réaction ont été ajoutés à chaque puits de la plaque ELISA. Cette dernière réaction a duré 30 minutes avant la lecture de l'absorbance à 450 nm. Les concentrations obtenues ont été exprimées en µg/kg (ppb) en référence à l'équation de la courbe de calibration du Kit ELISA.

3. *Analyse microbiologique et physicochimique de l'eau d'élevage :*

3.1. La qualité microbiologique

Des échantillons d'eaux à partir des étangs d'élevages de la ferme aquacole algérienne "Fat-Steppes" ont été prélevés en trois prises différentes. Des méthodes normalisées ISO ont été utilisées afin de dénombrer des bactéries indicatrices et les bactéries pathogènes sur des milieux de culture prêts à l'emploi fournis par l'institut Pasteur d'Alger (Algérie).

3.1.1. *Bactéries indicatrices*

Quatre groupes de bactéries indicatrices ont été explorées comme suit :

➤ la **flore aérobie mésophile** totale (FMAT) a été dénombrée sur la gélose PCA (Plate Count Agar) selon la norme ISO 6222. Deux dilutions décimales successives ont été utilisées. 1 ml de chaque dilution a été réparti en goutte au fond de la boîte correspondante (pour chaque dilution, deux boîtes de Pétri ont été utilisées). Les gouttes ont été ensuite recouvertes d'une couche de gélose PCA en surfusion (45 - 47°C), et le tout a été homogénéisé avec des mouvements circulaires. Une fois la gélose refroidie, elle a été recouverte d'une seconde couche de gélose PCA, ce qui a pour effet d'immobiliser les bactéries, et de former des colonies bien définies. Les boîtes de Pétri ainsiensemencées ont été incubées à 30°C pendant 72h. Les colonies étaient dénombrables si leur nombre était compris entre 30 et 300. La formule mathématique suivante a été utilisée :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V \text{ ml} \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d_1}$$

Où : N : nombre d'UFC par gramme de produit initial ; \sum Colonies : Somme des colonies de boîtes interprétables ; V ml : Volume de la solution déposé (1ml) ; n_1 : Nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue ; n_2 : Nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue ; d_1 : Facteur de la première dilution retenue.

MATERIELS & METHODES

➤ la numération des **coliformes totaux** et des **coliformes fécaux** a été réalisée par la méthode ISO 9308-2 de détermination du nombre le plus probable (NPP) par inoculation de tubes en milieux liquides. Dans une première phase d'inoculation, neuf tubes remplis (9 ml) avec le milieu bouillon lactosé pourpre de bromocrésol (BCPL) à différentes concentrations ont été utilisés. Trois tubes (1^{ère} série) étaient à double concentration et six tubes à simple concentration. 10 ml, 1 ml et 0,1 ml de la solution mère ont été additionnés, respectivement, aux trois tubes à double concentration, aux trois tubes à simple concentration de la 2^{ème} série et aux trois tubes à simple concentration restants. Les tubes ont été ensuite homogénéisés, le gaz a été chassé dans les cloches de Durham et les tubes ont été incubés 24 h à 48 h à 37°C. Sont considérés comme positifs les tubes présentant un dégagement de gaz (recueilli dans les cloches) et un virage de la couleur du milieu au jaune (témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

La numération des coliformes fécaux (désignés aussi par les coliformes thermotolérants est une étape subséquente à la précédente (repiquage sur milieu de confirmation). A partir des tubes positifs du test précédent, 1 ml a été prélevé,ensemencé dans 9 ml de milieu Schubert stérile et incubé 24 heures à 44°C. Sont considérés comme positifs les tubes présentant un anneau rouge en surface du tube qui témoigne de la production d'indol dans le milieu après ajout de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs. La table de Mac Grady a été utilisée pour le dénombrement des troubles formant colonies ou TFC.

➤ Les **Streptocoques fécaux** ou **thermotolérants** ont été dénombrés selon la méthode ISO 7899-1. Dans un premier test présomptif, 1 ml de la suspension mère et des dilutions décimales ont été ensemencés dans 9 ml du milieu de Rothe (tubes contenant de l'azoture de sodium (NaN₃) qui inhibe la plupart des microorganismes) et incubés à 37°C pendant 24 heures à 48 heures. Pour le test confirmatif, de l'éthyle violet a été additionné au milieu de Rothe pour le rendre sélectif (milieu de Litzky) et spécifique aux streptocoques fécaux. Les tubes ont été incubés 24 h à 48 h à 37°C. Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble bactérien avec parfois formation d'un culot violet. Les résultats ont été exprimés par le NPP dans 100 ml selon la table de Mac-Grady.

➤ les **anaérobies sulfito-réducteurs** ont été dénombrés selon la méthode ISO 6461-2. 1 ml de la solution mère et des dilutions décimales ont été portés aseptiquement dans des tubes. 15 ml de gélose viande-foie sulfitée (sulfite de sodium) et 4 à 5 gouttes d'Alun de fer ont été additionnés. Les tubes ont été recouverts avec une couche de paraffine afin d'empêcher

MATERIELS & METHODES

l'introduction d'oxygène et laissés se solidifier pendant 30 minutes. La première lecture s'est faite impérativement à 16 heures car les colonies des clostridies sulfite-réducteur sont envahissantes. Les colonies noires d'un diamètre supérieur à 0,5 mm sont comptabilisées comme positives. Les tubes positifs ont été exprimés en nombre le plus probable (NPP) dans 100 ml selon la table de Mac-Grady.

3.1.2. Bactéries pathogènes :

Afin de dénombrer quelques bactéries pathogènes nous avons procédé à une première phase d'enrichissement, où 10 ml de la solution mère ont été ajoutés à 100 ml de bouillon au sélénite et les tubes ont été incubés 24 heures à 37°C.

Par la suite, nous avonsensemencé quatre différents milieux sélectifs afin de cibler des staphylocoques, des salmonelles et shigelles, des *E. coli* et des *Pseudomonas* spp.

➤ les **Staphylococoques** ont été recherchés sur milieu gélosé Chapman par ensemencement en surface de 0,1 ml de la solution mère. Les boîtes ont été incubées 30 heures à 37°C selon la méthode ISO8199.

➤ les **Salmonelles et les Shigelles** ont été investiguées selon la norme ISO 6579. A partir d'une öse ou d'une goutte du milieu d'enrichissement un isolement sur gélose SS (Salmonelle-Shigelle) a été réalisé. Après 48 h d'incubation à 37°C, les colonies ont été microscopiquement dénombrés et comptabilisées. Les colonies se présentent sous les aspects suivants:

- ✳ des colonies rouges : *Enterobacter*, *Klebsiella* et autres coliformes tels *Escherichia coli*;
- ✳ des colonies incolores à centre noir : *Salmonella* à H_2S^+ , *Proteus vulgaris* et *mirabilis*;
- ✳ des colonies incolores transparentes : *Salmonella* à H_2S^- , *Shigella*, *Serratia*, *E. Hafniae*, *Alkalescens*, *Proteus morgani*;
- ✳ des colonies à centre orangé : *Proteus rettgeri*, *Providencia*;
- ✳ des colonies rouges à centre noir : *Citrobacter freundii* (en réalité seul le centre noir est visible d'où confusion avec *Salmonella*), *Arizona*.

➤ Les ***Escherichia coli*** ont été recherchés selon la méthode ISO 4832 sur le milieu EMB (gélose éosine bleu de méthylène) après incubation de 24 heures à 37°C.

➤ la recherche des ***Pseudomonas* spp** a été réalisée par un ensemencement à partir de la solution mère sur les milieux gélosés King A et King B selon la méthode ISO 16266.

MATERIELS & METHODES

Après incubation de 24 à 48 heures à 35°C, apparaissent sur le milieu des colonies plates ou légèrement surélevées, opaques à bords irréguliers ou finement dentelées de couleur blanchâtre à légèrement beige. Après 2 - 3 jours on assiste à un bleuissement ou verdissement du milieu de culture dû aux pigments fabriqués et diffusés par la bactérie (pyocyanine et pyoverdine par *Pseudomonas aerogenosa* et *Pseudomonas fluorescens*, respectivement).

3.2. La qualité physicochimique

Des échantillons d'eau à partir de la ferme aquacole algérienne "Fat-Steppes" (différentes prises), à partir des aquariums expérimentaux du laboratoire *AQUABIOR* (lors des expériences de contamination des tilapias avec l'acide oxolinique) et tout au long de l'expérience d'inversion sexuelle à la MT réalisée au CEFRA ont été contrôlés. La température, le pH et l'oxygène dissout ont été mesurés respectivement en utilisant un thermomètre à mercure, un oxy-pH-mètre de type HANNA. Les nitrites, les nitrates et l'ammoniac ont été mesurés par des méthodes colorimétriques en utilisant des Kits composés de réactifs prêts à l'emploi et d'un colorimètre multiparamètres pour l'aquaculture de type HANNA (HI 83203 Multiparameter Ion Specific Meter for Aquaculture) au niveau d'*AQUABIOR* et de type HACH au niveau du CEFRA.

☀ Les nitrates ont été analysés par la méthode de réduction au cadmium (réactif : HI 93728-01). C'est est une réaction en deux étapes :

=> Dans un premier temps, les nitrates sont réduits en nitrites par des ions cadmiun (cd^{2+}).

=> Les nitrites ainsi formés sont dosés via une adaptation de la méthode de Griess.

Le principe du dosage est basé sur la réaction de Griess (diazotation d'une amine primaire aromatique en présence d'un nitrite en milieu acide puis copulation avec une autre amine aromatique):

1- Action du nitrite (NO_2^-) sur la sulfanilamide en milieu acide et formation d'un sel de diazonium.

2- Réaction du sel de diazonium sur le *N*-(1-Naphtyl) éthylènediamine (NED) en milieu chlorhydrique ($pH < 2$).

Le composé final est rose (colorant azoïque) absorbe à $\lambda = 543$ nm.

☀ Les nitrites ont été analysés par la meme méthode de Griess avec le réactif HI 93708-01.

☀ L'ammoniac non ionisé (NH_3) a été mesuré par la méthode de Nessler (réactif : HI 93715-01). Le réactif de Nessler est un mélange, en milieu alcalin, d'iodure de potassium (KI) et d'iodure mercurique (Hg_{I_2}). En présence d'ammoniac, on obtient un composé jaune orangé.

✚ La qualité chimique de l'eau concerne également l'analyse des résidus de la MT dans l'eau par ELISA (la méthode analytique a été préalablement expliquée dans la page 65).

4. *Analyse microbiologique et chimique de l'aliment d'élevage*

✚ La qualité microbiologique de l'aliment d'élevage utilisé dans la ferme aquacole algérienne "Fat-Steppes" et au niveau du laboratoire *AQUABIOR* a été contrôlée selon la norme algérienne NA 6115 qui prévoit le dénombrement des paramètres microbiologiques suivants selon des méthodes normalisées ISO : germes aérobies 30°C (ISO 4833-2), *Escherichia coli* (ISO 9803-2), *Clostridium* sulfito-réducteurs à 46°C (ISO 7937), *Salmonella* (ISO 6579), *Staphylococcus aureus* (NF 08-14) et moisissures (ISO 21527-1). Les moisissures ont été dénombrées sur gélose glucosée au chloramphénicol après 3 à 5 jours d'incubation à 25°C.

✚ La qualité chimique de l'aliment concerne l'analyse des résidus d'acide oxolinique et des résidus de la MT dans l'aliment d'élevage par les méthodes HPLC/UV et ELISA respectivement. Les analyses de l'aliment ont été réalisées de la même façon que celles de la matrice de la chair du tilapia (méthodes préalablement expliquées en page 59 pour les résidus d'oxo et en page 66 pour la MT).

III. APPRECIATION DES DANGERS DE LA PHASE *POST MORTEM* EVALUATION DE LA FRAICHEUR

1. *Détermination du degré d'oxydation des lipides :*

95 spécimens de tilapias (*O. niloticus*) ont été fournis par la ferme aquacole "Fat-Steppes". Les poissons ont été transportés vivants au laboratoire d'Aquaculture et Bioremediation (*AQUABIOR*). Dès leur arrivée, les tilapias (120 – 160 g) ont été dispatchés en deux lots avant d'être euthanasiés par une dose létale de benzocaïne (Sigma), (200 mg l⁻¹). Le premier lot a été conservé au réfrigérateur à 4°C et le second a été maintenu à température ambiante (30°C). Pour les premières 12 heures, 5 échantillons ont été prélevés à un intervalle de 3 heures à partir des deux lots étudiés. Par la suite, l'échantillonnage (n = 5) a été réalisé quotidiennement jusqu'au 3^{ème} jour pour le lot conservé à température ambiante (30°C) et jusqu'au 7^{ème} jour pour le lot réfrigéré (4°C). Les mêmes poissons ont servi pour réaliser l'extrait lipidique et analyser les diènes conjugués, les hydroperoxydes et les TBARS.

MATERIELS & METHODES

1.1. Extraction des lipides

Les lipides totaux à partir de la chair du tilapia ont été extraits par la méthode de Folch *et al.* (1957). Elle repose sur le principe d'une extraction à froid des lipides par un solvant composé de chloroforme et de méthanol (2/1 ; v/v). Le chloroforme extrait les lipides et le méthanol dissocie ces derniers des autres constituants membranaires. L'addition d'une solution aqueuse de NaCl à 0,58 % (p/v) favorise l'obtention d'un système biphasique. La phase supérieure constituée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) dont la dissolution est favorisée par la présence de sel tandis que les lipides sont dissous dans la phase chloroformique inférieure (Dumay, 2006).

Protocole

5 g d'échantillon ont été homogénéisés avec un mélange de 30 ml de méthanol (*Sigma-Aldrich, réf. 34860-1L-R*) froid (4°C), 60 ml de chloroforme (*Sigma-Aldrich, réf.650498*) et 2,25 mg de BHT (*ButylHydroxytoluène ; Sigma-Aldrich, réf. W218405*) pendant 10 minutes dans un ballon placé dans de la glace. Le BHT et la glace permettent de limiter l'oxydation lipidique au cours de l'extraction. L'homogénat a ensuite été filtré à travers un filtre Whatman n°1. Le filtrat a été transvasé dans une ampoule à décanter et 22 ml d'une solution de NaCl (*Sigma-Aldrich, réf. S7653*) à 0,58 % ont été ajoutés. L'ensemble a été agité puis mis à décanter 12 heures à +4°C et à l'obscurité.

La phase chloroformique inférieure a été récupérée dans un ballon et évaporée à 39°C sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Hahn ShinScientific Co, Modèle : HANVAPOR). La quantification de la teneur en lipides a été réalisée par la pesée du ballon vide et de celui contenant le résidu lipidique après évaporation. La teneur en lipides a été exprimée en g de lipides pour 100 g de matière fraîche (M.F) d'échantillon.

1.2. Diènes conjugués

Les diènes conjugués, produits primaires de l'oxydation des lipides, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoyde des acides gras polyinsaturés. Les diènes conjugués possèdent un maximum d'absorption à $\lambda = 233$ nm (Klein, 1970 ; Corongiu & Banni, 1994).

Protocole

Un volume d'extrait lipidique, contenant environ 0,5 mg de lipides, a été évaporé sous courant d'azote puis repris dans 1 ml d'isopropanol/heptane (3/1, v/v). Les absorbances des échantillons

MATERIELS & METHODES

ont été lues à 233 nm et à 214 nm. L'indice de diènes a été obtenu par calcul du rapport des absorbances mesurées à ces deux longueurs d'onde (A233/A214). Ce calcul permet de corriger les variations de concentrations en lipides liées aux prélèvements, car la longueur d'onde 214 nm correspond au point isobestique (Klein, 1970). Les analyses ont été réalisées en double sur chacun des cinq extraits lipidiques obtenus pour chaque échantillon.

1.3. Hydroperoxydes

La méthode colorimétrique développée par Eymard et Génot (2003) a été utilisée pour le dosage des hydroperoxydes (ROOH), mettant en œuvre le xylénol orange. Cette méthode permet de travailler directement sur l'échantillon sans passer par une extraction des lipides, méthode lourde et susceptible de modifier la teneur initiale en hydroperoxydes. Les hydroperoxydes extraits de l'échantillon par le méthanol, en condition d'acidité favorable, oxydent le Fe^{2+} (présent dans le réactif) en Fe^{3+} . Ce dernier forme un complexe coloré avec le xylénol orange qui possède un maximum d'absorption à 560 nm.

Protocole

a. Préparation du réactif de FOX 2

Le réactif FOX 2 était composé d'une solution (100 μ M) de xylénol orange ($C_{31}H_{32}N_2O_{13}$; Fluka, réf. 95615) dans du méthanol contenant 1/10^e (v/v) d'une solution aqueuse d' H_2SO_4 250 mM (Aldrich, réf. 339741) et de sulfate de fer et d'ammonium 2,5 mM ($FeH_8N_2S_2, 6H_2O$; Fluka, réf. 09719).

b. Extraction :

A 3 g d'échantillon pesés précisément ont été ajoutés 30 ml de méthanol froid (4°C) dans un tube à centrifugation. Le mélange a été homogénéisé 15 secondes à l'Ultra-Turrax. Après centrifugation pendant 20 minutes à 6000 rpm, le surnageant a été filtré à travers un filtre Whatman n°1. Enfin, 250 μ l du filtrat ont été mélangés avec 50 μ l de méthanol et 2700 μ l de réactif FOX 2 dans des micro-tubes. Après 50 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances ont été mesurées en double à $\lambda = 560$ nm contre le blanc composé de 300 μ l de méthanol et 2700 μ l de réactif FOX 2.

Les hydroperoxydes présents dans l'extrait ont été quantifiés par spectrophotométrie faisant référence à l'équation ($y = 0,0421x - 0,0094$) de la droite de la courbe étalon d'hydroperoxydes de cumène (CuOOH), qui est réalisée dans le méthanol pour des concentrations variant de 0 à 20 μ M. Les résultats ont été exprimés en mmoles Eq CuOOH/kg de matière fraîche (M.F).

MATERIELS & METHODES

1.4. TBARS :

La détermination de la teneur en TBARS a été réalisée par une technique mise au point par Génot (1996) et qui est une adaptation des méthodes de Salih *et al.* (1987) et Bostoglou *et al.* (1994). Les produits secondaires de l'oxydation des lipides les plus couramment dosés sont les aldéhydes. L'acide thiobarbiturique (TBA) réagit entre autre avec le malonaldéhyde (MDA) pour former un complexe de couleur rose possédant un maximum d'absorption à la longueur d'onde 532 nm.

Protocole

Dans des tubes Falcon (25 ml) déposés dans de la glace pilée ont été ajoutés et homogénéisés à l'ultra-Turrax 3 g de chair de tilapia, 100 µl de solution de BHT (1 mg/ml) dans de l'éthanol (*Fluka, réf. 02860*) et 16 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 5 % (*Sigma-Aldrich, réf. T6399*). Le broyat a été filtré à travers un filtre plissé. A 2 ml de filtrat ont été ajoutés 2 ml de solution d'acide thiobarbiturique (TBA) (*Sigma-Aldrich, réf. T5500*). Pour les blancs, 2 ml de solution de TBA ont été mélangés avec 2 ml de TCA à 5 %. Les tubes ont été fermés et incubés dans un bain-marie pendant 30 minutes à 70°C. La réaction a été bloquée par le refroidissement des tubes dans un bain d'eau froide. La lecture de l'absorbance des TBARS extraits des échantillons par l'acide thiobarbiturique a été effectuée au spectrophotomètre aux longueurs d'onde : 508, 532 et 600 nm. Dans le but de minimiser le bruit de fond observé sur les spectres d'absorbance et d'améliorer la sensibilité de la méthode, la mesure d'absorbance à $\lambda_{\max} = 532$ nm a été corrigée selon la formule (Génot, 1996):

$$A_{532\text{corrigée}} = A_{532} - [(A_{508} - A_{600}) \times (600 - 532)] / (600 - 508) - A_{600}$$

La conversion de l'absorbance, mesurée à 532 nm, en équivalents de malonaldéhyde (mg/kg d'échantillon) a été obtenue en utilisant le coefficient d'extinction molaire du complexe MDA-TBA : $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Buedge & Aust, 1978). Le mode de calcul a été le suivant :

$$\text{mg équivalent MDA/Kg} = (A_{\text{corrigée}} \times V_{\text{TCA}} \times 2 \times M \cdot 10^{-2}) / (1,56 \times m)$$

Avec V_{TCA} : volume du solvant d'extraction (16 ml) ; m : masse de l'échantillon analysée (g) ; M : masse moléculaire du malonaldéhyde = $72 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

2. **Détermination des indices de la protéolyse :**

36 spécimens de tilapias (*O. niloticus*) ont été fournis vivants à trois reprise par le CEFRA (Tihange, Belgique). Le premier quota (36 poissons) a servi pour l'évaluation de l'ABVT et de la TMA. Le second quota a été utilisé pour l'analyse des amines biogènes et enfin le dernier quota pour l'analyse sensorielle, l'analyse microbiologique et le pH sur les mêmes sujets.

MATERIELS & METHODES

Dès leur arrivée, les tilapias (140 - 220 g) ont été dispatchés en deux lots avant d'être euthanasiés par une dose létale de benzocaïne (Sigma), (200 mg L⁻¹). Le premier lot a été conservé au réfrigérateur à 4°C et le second a été maintenu dans un incubateur à 30°C. Les échantillons à partir des deux conditions de conservation (4°C & 30°C) ont été analysés en triplicat (n = 3) pendant le premier jour (24 heures) à 6 heures d'intervalle après le sacrifice. Par la suite, l'échantillonnage (n = 3) a été réalisé quotidiennement jusqu'au 5^{ème} jour pour le lot réfrigéré (4°C).

2.1. ABVT & TMA

La dénomination Azote Basique Volatil Total (ABVT) s'applique à l'ensemble formé par l'ammoniac (NH₃) et les amines volatiles diméthylamine (DMA) et triméthylamine (TMA). La méthode officielle de référence par distillation à la vapeur d'eau selon le règlement européen n° 2074/2005 (EU, 2005b) a été utilisée pour extraire l'ABVT, qui a ensuite été dosé par titration en retour. Pour doser spécifiquement l'azote généré par la TMA, la même méthode de distillation a été appliquée, en ajoutant du formaldéhyde dans le tube à distiller. L'utilisation du formaldéhyde permet de bloquer les amines primaires et secondaires (Malle & Tao, 1987). Cette technique repose sur le principe d'une extraction des bases azotées volatiles d'un échantillon au moyen d'une solution d'acide perchlorique. Après alcalinisation, l'extrait est soumis à une distillation à la vapeur et les constituants basiques volatils sont absorbés par un récepteur acide. La concentration en ABVT est déterminée par titrage des bases absorbées.

Protocole

10 g d'échantillon de chair de poisson ont été homogénéisés dans 90 ml d'une solution d'acide perchlorique à 0,6 mol/l (*Aldrich, réf. 311421*) au moyen d'un Ultra-Turrax. L'homogénat a ensuite été filtré. Le filtrat a été conservé au réfrigérateur pendant 7 jours avant sa distillation.

50 ml de l'extrait ont été mis dans un tube de distillation (type Kjeldahl) qui a été immédiatement placé dans le dispositif de distillation (*Vapodest*). Le réglage préalable de ce dispositif a permis le lancement de deux principales étapes successives qui sont l'addition automatique de 6,5 ml de solution de NaOH 20 % (*Sigma-Aldrich, réf. S8045*) dans le tube de distillation suivi de 10 minutes de distillation à la vapeur. Le tube d'écoulement de distillation a été immergé dans un Erlenmeyer contenant 50 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,01 N Titrisol[®] (H₂SO₄), *Merck, réf. 109998*), à laquelle ont été ajoutées 3 à 5 gouttes d'indicateur de Tashiro (composé de 2 g de rouge de méthyle 1 g de vert de bromocrésol qui sont dissouts dans 1000 ml d'éthanol à 95 %).

MATERIELS & METHODES

La solution finale a été titrée avec une solution NaOH 0,01 N Titrisol® (*Merck, réf. 109959*) contenue dans une burette de 50 ml graduée (1/100 ml).

Les analyses ont été réalisées en double. Les résultats sont pris en considération si la différence entre les deux analyses ne dépasse pas 2 mg/100 g. L'essai à blanc a été effectué en chargeant 50 ml de solution d'acide perchlorique à la place de l'extrait dans le tube de distillation.

Le calcul de la concentration a été effectué par l'application de l'équation suivante :

$$\text{ABVT (en mg N/100 g) ou TMA (en mg N/100 g)} = [(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 2 \times 100] / M$$

Avec V_1 = volume du NaOH à 0,01 mol/l en ml pour l'échantillon ; V_0 = volume du NaOH à 0,01 mol/l en ml pour le témoin ; M = masse de l'échantillon en g.

Le rendement de l'extraction de la méthode a été vérifié au moyen d'échantillons blancs dopés avec 1 ml d'une solution de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 5,35 mg/ml (correspondant à 1,4 mg N).

2.2. Amines biogènes

Une nouvelle méthode HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) a été mise au point et développée pour déterminer six amines biogènes (putrescine, cadavérine, histamine, spermine, spermidine et tyramine) dans la chair du tilapia. L'extraction des amines biogènes à partir de la chair du poisson a été réalisée selon la méthode de Lapa-Guimarães & Pickova (2004). La dansylation a été adaptée à partir de la méthode chromatographique de Jia *et al.* (2012).

2.2.1. Réactifs

Les standards d'amines biogène et les réactifs ont été fournis par Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) : dihydrochlorure d'histamine (H7250), dihydrochlorure de putrescine (P7505), cadaverine (D22606), spermidine (S2626), spermine (S3256) et tyramine (T90344), acide trichloroacétique, carbonate de sodium Na_2CO_3 (451614), ammoniac, acétone (650501), chloroforme (650498), diethyle éther (309966), triéthylamine (T0886) et chlorure de dansyle (D2625).

2.2.2. Préparation des solutions

- Solution d'amine biogène de stock :

Les solutions de stock (SS) des six amines biogènes ont été préparées à une concentration de 1,5 mg/ml dans du TCA à 5 %.

- Solution d'amine biogène finale

MATERIELS & METHODES

La solution finale (S.F), (15 µl/ml) a été obtenue en diluant 100 fois la solution d'amine biogène de stock (1,5 mg/ml) dans du TCA à 5 %. Les solutions ont été conservées au réfrigérateur (4°C).

- Le chlorure de dansyle a été préparé à une concentration de 2 mg/ml dans de l'acétone.
- Le pool des six amines biogènes a été préparé à partir de leurs solutions stock dans du TCA à 5 % et concentré à 2,5 µg/ml.
- Pour la préparation des courbes de calibration, en solutions standards, huit solutions finales ont été préparées selon les dilutions reprises dans le tableau VIII. Des solutions d'amines biogènes concentrées de 2 à 24 ng/2 µl ont été spotées sur la plaque HTPLC afin de correspondre à des concentrations ascendantes allant de 25 à 300 ppm obtenues après la dansylation pour chaque amine biogène.

Tableau VIII : Concentrations d'amines biogènes pour la préparation des courbes étalons.

Solution	Dilution	Dilution totale	ng/µl	Concentrations d'amine biogène à spoter ng/ 2 µl / 80µg d'extrait de chair	Concentrations d'amine biogène à obtenir après dansylation µg/kg (ppm)
1 ml Sol A* + 1 ml TCA 5 %	2	50	12	24	300
1 ml Sol A* + 1,4 ml TCA 5 %	2,4	60	10	20	250
1 ml Sol A* + 1,66 ml TCA 5 %	2,66	66,6	9	18	225
0,5 ml Sol A* + 1 ml TCA 5 %	3	75	8	16	200
0,5 ml Sol A* + 1,5 ml TCA 5 %	4	100	6	12	150
0,5 ml Sol A* + 2,5 ml TCA 5 %	6	150	4	8	100
0,25 ml Sol A* + 2,75 ml TCA 5 %	12	300	2	4	50
0,125 ml Sol A* + 2,875 ml TCA 5 %	24	600	1	2	25

Sol A* : solution d'amine biogène diluée préalablement à partir de la solution de stock (1,5 mg/ml) : 300 µl dans 7,5 ml TCA 5 % (dilution : 25 fois).

2.2.3. Protocole

a. Extraction :

5 g de chair de poisson ont été homogénéisés dans un tube Falcon (50 ml) contenant 20 ml TCA à 5 % (Ultra-Turrax) pendant 1 min. Ensuite, le tube a été centrifugé 10 mn à 4000 rpm à 18°C puis filtré. Le précipitat a été lavé deux fois avec 10 ml de TCA à 5 %, centrifugé et filtré à chaque fois. Le filtrat total a été collecté et complété jusqu'à 50 ml avec du TCA à 5 %. Les extraits ont été conservés plusieurs jours dans le frigo.

b. Dansylation :

Dans des tubes en verre de 10 ml, 1 ml d'extrait ou 1 ml de la solution finale d'amine biogène a été additionné de 500 µl de solution de Na₂CO₃ saturée et 1 ml de chlorure de dansyle (DnsCl). Les tubes ont été scellés et incubés pendant 45 min à 40°C dans un bain-marie.

MATERIELS & METHODES

Ils ont ensuite été retirés et refroidis à température ambiante puis additionnés de 70 μ l d'ammoniac avant de les laisser agir pendant 10 min. Enfin, les tubes ont été centrifugés 10 mn à 4000 rpm à 18°C.

c. Dépôt & révélation :

2 μ l de la solution finale ont été spotés manuellement (micropipette) ou automatiquement (Figure 16) (en utilisant le CAMAG - Linomat 5 qui est muni d'une seringue Hamilton 1 ml pour avoir des spots réguliers) sur plaque HPTLC silica gel G60 (Merk, Darmstadt, Germany) 10cm x 10cm. Ensuite, les amines biogènes ont été éluées verticalement avec une phase mobile constituée de chloroforme/ triéthylamine / diéthyle éther (4 :1 :1) (v/v/v). La plaque a été séchée avant d'être révélée sous lampe UV ($\lambda=254$) pour un simple screening ou encore scannée pour une quantification grâce à un densitomètre (CAMAG TLC Scanner 3) (Figure 17). Le densitomètre est piloté par le logiciel WinCat qui permet de traduire l'intensité des spots en pics chromatographiques. La méthode quantitative a été optimisée au sein du laboratoire de pharmacologie, pharmacothérapie et toxicologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (ULg).



Figure 16 : Spotteur automatique CAMAG-Linomat 5 (ULg, 2012).



Figure 17 : Densitomètre CAMAG TLC Scanner 3 (ULg, 2012).

Les amines biogènes présentes dans les extraits de chair de tilapia ont été quantifiées en référence à l'équation de la droite de la courbe de calibration de chaque amine biogène standard obtenue séparément (relation entre la surface du pic chromatographique et la concentration de l'amine biogène en μ g/kg).

MATERIELS & METHODES

2.2.4. Evaluation des paramètres de performance de la méthode HPTLC

Dans un premier temps, les rapports frontaux (Rf) des six amines biogènes ont été mesurés, la limite de détection et la linéarité de la méthode ont été déterminées.

✚ Le rapport frontal (Rf) représente le rapport entre la distance parcourue par l'amine biogène dansylée et la distance parcourue par le front de la phase mobile. Pour ce faire, nous avons déposé individuellement les six amines biogènes ainsi que leurs pools sur la même plaque HPTLC afin d'identifier leur positionnement. Par la suite nous avons calculé le rapport entre la hauteur parcourue de chaque amine et les 8 cm parcourue par la phase mobile.

✚ La limite de détection a été déterminée par l'application de concentrations ascendantes (5 µg/g - 200 µg/g) de pools des six amines biogène sur la même plaque HPTLC. Par la suite nous avons identifié la concentration minimale de révélation.

✚ La linéarité de la méthode a été déterminée à partir des courbes de calibration préparées en standards d'amines biogènes (paramètre préalablement expliqué dans la partie : préparation des solutions dans la page 77).

Dans le cadre de cette étude, d'autres paramètres de performance de la méthode HPTLC ont été également évalués en référence à la décision européenne 2002/657/CE (EC, 2002).

✚ La fidélité de la méthode a été évaluée en termes de répétabilité (trois essais réalisés le même jour) et de reproductibilité (trois essais réalisés en trois jours différents). Trois concentrations croissantes (50 µg/g, 100 µg/g, 200 µg/g) de chaque amine standard ont été testées en triple.

✚ La justesse de la méthode (étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée) a été vérifiée lors des essais d'évaluation de la fidélité de la méthode.

✚ L'exactitude de la méthode (étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée) a été contrôlée par le dopage d'échantillons blancs de chair de tilapia frais avec trois concentrations ascendantes (25, 50 et 100 µg/g) de pools des six amines biogènes étudiées. Les analyses ont été réalisées en triple.

3. Analyse microbiologique du tilapia :

Afin de déterminer la qualité microbiologique du tilapia conservé à température ambiante (30°C) et à température de réfrigération (+4°C), la flore aérobie mésophile totale (FMAT) a été dénombrée sur la gélose PCA (Plate Count Agar)ensemencée en masse et incubée 72 heures à 30°C et les Entérobactéries (ENT) ont été isolées sur la gélose VRBG (Violet Red Bile

MATERIELS & METHODES

Glucose Agar) ensemencée en masse et incubée 24 heures à 30°C selon les méthodes ISO respectives : 4833-2 et 21528-1.

La solution mère a été préparée à partir de 25 g de chair de tilapia + peau (en proportions naturelles) homogénéisés dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) au moyen d'un stomacher. Les dilutions décimales ont été préparées à partir de la solution mère jusqu'à l'obtention de dilutions titrant à 10^{-4} . Les résultats ont été exprimés en log ufc/g.

4. Analyse du pH :

Le pH (paramètre biochimique et microbiologique) a été mesuré directement à partir du muscle de tilapia en utilisant un pH-mètre Knick type 756 combiné à une pH-électrode (Ingold réf. 104063123) selon la méthode ISO 2917. La valeur moyenne de trois prises sur trois endroits différents du muscle a été retenue.

5. Analyse sensorielle :

L'appréciation organoleptique a été réalisée en triple sur des tilapias entiers. Deux méthodes d'analyse sensorielle ont été choisies et combinées afin d'optimiser une nouvelle méthode d'index qualité (QIM) adaptée pour le tilapia (Tableau IX). La première méthode a servi pour la description des paramètres organoleptiques à partir du système de cotation européen régit par le règlement (CE) N° 2406/96 (EU, 1996b). La seconde a servi pour l'attribution des scores de démérite selon le schéma de QIM proposé par Baixas-Nogueras *et al.* (2003). Le test sensoriel a été effectué par trois membres scientifiques du laboratoire à six heures d'intervalle pour le premier jour de prélèvement puis quotidiennement pour les jours restants de l'expérience (5 jours) pour le lot réfrigéré. Trois paramètres physiques ont été principalement appréciés ; l'apparence générale (aspect générale de la peau, texture de la chair et présence du mucus), les branchies (leur odeur et couleur) et enfin les yeux (leur forme, la clarté de la cornée et la couleur de la pupille). Un score de 0 à 3 a été attribué pour chaque paramètre étudié. Un score total de 24 point a signifié un rejet organoleptique du poisson.

MATERIELS & METHODES

Tableau IX : Schéma de la Méthode d'Index de Qualité (QIM) pour l'analyse sensorielle du Tilapia (*Oreochromis niloticus*) combinant le règlement (CE) N°2406/96 et la méthode de Baixas-Nogueras et al., 2003).

Paramètre de Qualité	Description	Score
Apparence générale		
Peau	Pigmentation vive et iridescente	0
	Pigmentation vive mais sans éclat	1
	Pigmentation ternie en voie de décoloration	2
	Pigmentation ternie	3
Consistance de la chair	Très ferme, rigide	0
	Assez rigide, ferme	1
	Un peu molle	2
	Molle (Flasque)	3
Mucus cutané	Aqueux, transparent	0
	Légèrement trouble	1
	Laiteux	2
	Gris jaunâtre, mucus opaque	3
Yeux		
Cornée	Transparente	0
	Légèrement Opalescente	1
	Opalescente	2
	Laiteuse	3
Pupille	Noire brillante	0
	Noire ternie	1
	Opaque	2
	Grise	3
Forme	Convexe	0
	Convexe et légèrement affaissée	1
	Plate	2
	Concave au centre	3
Branchies		
Couleur	Vive; pas de mucus	0
	Moins colorée; mucus transparent	1
	Brune / grise se décolorant; mucus opaque et épais	2
	Jaunâtre; mucus laiteux	3
Odeur	D'algues marines fraîches; acre, iodée	0
	Absence d'odeur ou odeur d'algues marines, odeur neutre	1
	Odeur grasse un peu sulfureuse, de lard rance ou de fruit pourri	2
	Odeur aigre de putréfaction	3
Fourchette du score total du rejet sensoriel (points de démérite) : 0 – 24		

IV. ANALYSES STATISTIQUES

En fonction du paramètre étudié une analyse statistique a été adoptée.

1. *Analyse statistique des résultats des résidus d'acide oxolinique :*

L'analyse statistique des résultats obtenus lors de l'analyse des deux lots de tilapias contaminés avec de l'acide oxolinique a été réalisée avec le système SAS (Statistical Analysis System, 2000) en utilisant un modèle de type GLM (General Linear Model) et une régression quadratique.

- Dans un premier temps, l'influence des paramètres expérimentaux sur les résultats du screening et de l'analyse chromatographique a été analysée.

Les paramètres expérimentaux ont été : le temps de prélèvement, le lot, le poids des poissons, l'O₂ dissous, le pH de l'eau, le taux de nitrite, le taux de nitrate et le taux d'ammoniac.

- Dans un second temps, la comparaison entre les deux lots de tilapias contaminés a été analysée.

- Enfin, la corrélation entre les deux méthodes d'analyse et entre les deux résultats (screening & chromatographie) a été testée en calculant le coefficient de corrélation linéaire selon le test de Pearson.

2. *Analyse statistique des résultats des résidus de la 17 α -MT*

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System, 2000). L'effet du temps sur la concentration résiduelle de MT dans les lots traités a été analysé par un modèle de type General Linear Model (proc GLM ; SAS, 2000).

Le test de Chi-2 (χ^2) a été utilisé pour démontrer la différence statistique significative du taux d'inversion sexuelle ($P < 0,05$) entre les lots traités et le contrôle.

3. *Analyse statistique des résultats des paramètres physico-chimiques, organoleptiques et microbiologiques :*

En fonction du paramètre étudié, 3 ou 5 spécimens ($n = 3$ ou $n = 5$) ont été analysés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 17.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, III., USA). Dans tout les cas, les statistiques descriptives (moyennes \pm écarts types) ont été utilisées pour décrire l'ensemble des résultats. Les résultats ont été statistiquement interprétés par l'analyse de la variance (test paramétrique Anova 1). La différence entre les moyennes a été déterminée par le test de Tukey ($P < 0,05$).

La corrélation entre les différents paramètres analytiques a été testée par le coefficient de corrélation linéaire selon le test de Pearson.

RESULTATS

RESULTATS

I. DEMARCHE HACCP

1. *Evaluation des programmes préalables à l'HACCP*

L'exploitation algérienne de tilapiculture "Fat-Steppes" est située à la périphérie de la commune de Ain Skhoua (dont la traduction française signifie : source chaude) à 90 Km de la wilaya de Saida et à plus de 260 km de la Wilaya d'Oran- Ouest algérien. Elle est dans une zone steppique, à vocation agricole qui est connue pour sa source séculaire d'eau douce (le chott El-Chergui), à haut débit et naturellement chaude (30°C). Cette ferme privée a bénéficié du soutien de l'état au titre du programme national de développement de l'aquaculture (PNDA). Fat-Steppes s'étend sur sept hectares et dispose d'une trentaine d'étangs qui puisent leur eau directement de la nappe phréatique du grand chott "El-Chergui".

Cette ferme aquacole a été conçue pour assurer une capacité de production estimée à 600 tonnes de tilapia et 10 millions d'alevins par an en fonction de la demande. Concrètement, la production annuelle s'est limitée à une centaine de tonnes de poisson et un million d'alevins depuis 2008. La ferme fonctionne avec un effectif assez restreint : un gérant, 02 techniciens permanents et deux ouvrières pour le conditionnement des poissons. L'entreprise fait appel à un technicien égyptien expérimenté (prestataire) pour assurer l'étape de reproduction et l'inversion sexuelle des juvéniles de tilapia au mois d'avril de chaque année. Elle prévoit également des stagiaires et de la main d'œuvre supplémentaires lors de l'écoulement final des tilapias vers le mois d'octobre.

Le Plan 1 illustre la conception globale de "Fat-Steppes" et la répartition des différentes zones d'activité.

A travers ce plan, nous pouvons distinguer une vaste exploitation aquacole grillagée où les zones d'activités sont bien réparties. Il existe un bâtiment spécial pour la fabrication des aliments. La ferme fabrique son propre aliment d'élevage, elle dispose d'une machine granuleuse, de silos de stockage des matières premières et des salles de stockage de l'aliment à température ambiante.

La ferme détient une base de vie à l'étage qui est composée d'un réfectoire, d'un dortoir et d'un vestiaire avec douches et sanitaires.

Le bloc mitoyen représente l'administration avec des moyens informatiques de logistique. Un autre bloc plus isolé représente l'espace de conditionnement. Ce dernier renferme une grande chambre froide, un générateur de glaces pilées (alimentée par de l'eau douce), des plans de travail bâtis et un sas pour les caisses. Ce bloc possède une seule et unique porte qui sert d'entrée pour les tilapias (fraichement pêchés dans les étangs de grossissement) et de sortie

RESULTATS

pour les caisses pleines de poissons entiers et recouvert de glace. On constate l'absence de pédiluve à l'entrée, les ouvrières ne respectent pas les bonnes pratiques d'hygiène de bases (port de gants, de tenues spéciales, de charlottes...).

Plus loin, une trentaine d'étangs pour le grossissement des tilapias sont disposés en parallèle sur trois lignes et fonctionnent en circuit ouvert alimenté avec une eau naturellement chaude (26°C - 29°C) qui prend source à partir du grand Chott "El-Chergui".

A proximité des étangs, six grandes serres sont alignées sur trois rangées en parallèle. Les trois premières contiennent des bassins rectangulaires qui servent pour la reproduction, pour le traitement hormonal et pour le pré-grossissement des juvéniles de tilapia. Les autres serres renferment des bassins circulaires de pré-grossissement ou pour le stockage des reproducteurs. Les serres sont branchées dans un circuit fermé qui est alimenté en eau filtrée mécaniquement et biologiquement à renouvellement régulier. Les installations sont munies d'oxygénateurs et de distributeurs d'aliments automatiques.

Un vide sanitaire annuel est réalisé après chaque cycle d'élevage (du mois d'avril au mois d'octobre), pendant lequel toutes les infrastructures sont désinfectées et nettoyées.

Le flux du personnel est désordonné et représente une source de contamination croisée entre les différents secteurs d'activités.

Les effluents à partir des étangs ne subissent aucun traitement mécanique (ni décantation, ni filtration). Les eaux rejetées contribuent à l'irrigation de fermes agricoles voisines et servent de fertilisants naturels (fèces et reste d'aliment de tilapias).

Mis à part les eaux d'élevage et les eaux de rinçage des poissons avant conditionnement, il n'existe pas d'autres déchets au sein de cette ferme aquacole car les poissons sont vendus frais, entiers et non éviscérés.

RESULTATS

Plan1 : Ferme de tilapiculture "Fat-Steppes" de l'Ouest algérien

Bâtiment de conditionnement
(Chambres froides) +
Générateur de glace pilée



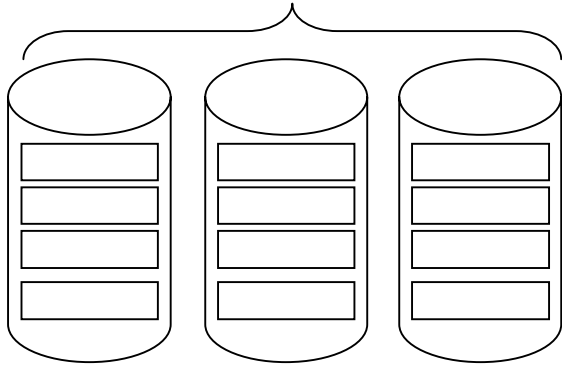
Espace pour
groupe
électrogène



Entrée principale

Portail

06 Serres contenant des bassins rectangulaires ou
circulaires pour la reproduction, l'éclosion et l'alevinage



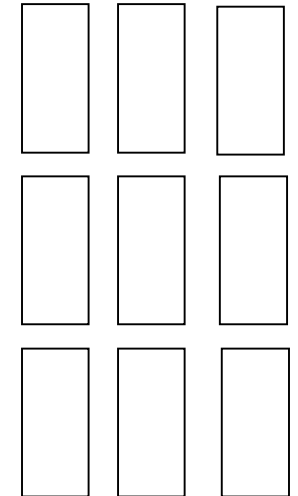
Administration

Base de Vie
(Dortoir &
Réfectoire)

Batiment de fabrication
des aliments +
Espace de stockage



Etangs
de grossissement
(Une trentaine)



Reproduction et pré-grossissement
en circuit fermé (eau filtrée)



RESULTATS

2. *Application du système HACCP*

2.1. Caractérisation du tilapia produit dans l'Ouest algérien

2.1.1. *Composition et caractéristiques chimiques de la chair du tilapia :*

Les résultats de l'analyse de la composition chimique du tilapia (*O. niloticus*) produit en Algérie sont repris dans le tableau X et comparés à ceux de la littérature.

Tableau X : Résultats de la composition chimique du tilapia produit à Fat-Steppes comparés à ceux de la littérature.

	Humidité (%)	Protéines (%)	Lipides (%)	Cendres (%)
Tilapia d'Algérie (cette étude)	80,7± 0,40	17,3 ± 0,40	0,33 ± 0,03	0,59 ± 0,12
Tongnuanchan et al. 2011	85,73 ± 0,93	13,19 ± 0,66	1,08 ± 0,05	0,49 ± 0,05
Emire & Gebremariam, 2009	79,87 ± 0,01	18,52 ± 0,08	0,98 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Ibrahim & El-Sherif, 2008	78,99 ± 0,37	17,42 ± 0,15	2,72 ± 0,23	0,85 ± 0,09

Moyenne ± Ecart-type (n = 3).

Les résultats obtenus démontrent une importante proportion de protéines chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) produit localement. Elle est de l'ordre de 17,3 %. La proportion lipidique du tilapia algérien est très faible, elle est inférieure à 0,5 %. La majeure proportion du tilapia est marquée par le taux élevé de l'humidité (> 80 %). L'activité de l'eau, facteur déterminant pour la croissance bactérienne, est de l'ordre de 0,99 dans l'*Oreochromis niloticus* algérien.

2.1.2. *Profil en acides aminés :*

Le tableau XI reprend les valeurs des acides aminés (exprimés en grammes d'acide aminé par 100 grammes de matière fraîche) du tilapia produit en Algérie comparés à ceux de la littérature. Nos résultats sont exprimés avec la molécule d'eau d'hydrolyse (acide aspartique pour asparagine et acide glutamique pour la glutamine).

Les résultats obtenus révèlent un profil en acides aminés du tilapia algérien plutôt appréciable. 18 acides aminés ont été détectés et quantifiés. Le profil protéique comprend les huit acides aminés essentiels (la lysine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la thréonine, la phénylalanine, la méthionine, et le tryptophane) dont les proportions moyennes varient entre un minimum de 0,95 ± 0,02 g pour le tryptophane et un maximum de 7,80 ± 0,02 g pour la lysine. Il comprend aussi le groupe des acides aminés dits semi-essentiels qui est composé d'arginine et d'histidine avec des proportions moyennes de l'ordre de 5,70 g et 2,62 g respectivement. Les valeurs des huit acides aminés non-essentiels (l'acide glutamique, l'acide aspartique,

RESULTATS

l'alanine, la glycine, la serine, la tyrosine, la proline et la cystéine) quantifiables restants fluctuent entre 1,18 g pour la cystéine et 12,01 g l'acide glutamique.

Tableau XI : Profil en acides aminés du tilapia (*O. niloticus*) produit à Fat-Steppe comparé à ceux de la littérature (g/100 g MF).

Acides aminés	Tilapia Algérie (cette étude)	Al-Kahtani <i>et al.</i> 1998	Paschoalick <i>et al.</i> 2003	Gonzales Jr & Brown 2006
Acide aspartique	8,18 ± 0,02	12,1 ± 0,1	9,20 ± 0,03	2,73
Thréonine*	4,27 ± 0,01	4,3 ± 0,3	4,18 ± 0,01	1,51
Serine	3,72 ± 0,01	3,7 ± 0,3	3,48 ± 0,02	1,55
Acide Glutamique	12,01 ± 0,02	22,5 ± 0,7	14,69 ± 0,03	4,41
Proline	2,72 ± 0,05	ND	3,03 ± 0,06	1,86
Hydroxyproline	ND	ND	ND	0,63
Glycine	4,04 ± 0,05	5,0 ± 0,1	3,97 ± 0,03	2,43
Alanine	4,91 ± 0,00	6,8 ± 0,0	5,50 ± 0,12	2,11
Arginine	5,70 ± 0,02	2,7 ± 0,3	6,15 ± 0,00	2,01
Valine*	4,64 ± 0,02	4,2 ± 0,2	4,29 ± 0,10	1,27
Isoleucine*	4,32 ± 0,00	4,8 ± 0,2	4,19 ± 0,14	1,23
Leucine*	6,84 ± 0,01	12,5 ± 0,7	7,35 ± 0,04	2,21
Tyrosine	3,26 ± 0,00	3,0 ± 0,1	2,84 ± 0,06	0,96
Phénylalanine*	3,70 ± 0,01	4,0 ± 0,0	3,55 ± 0,08	1,03
Histidine	2,62 ± 0,02	3,4 ± 0,0	2,05 ± 0,03	0,76
Lysine*	7,80 ± 0,02	3,3 ± 0,7	8,65 ± 0,07	2,19
Méthionine*	2,90 ± 0,02	1,9 ± 0,1	2,30 ± 0,00	1,16
Cystine	1,18 ± 0,02	ND	0,78 ± 0,06	0,41
Tryptophane*	0,95 ± 0,02	1,3 ± 0,0	ND	0,2

Moyenne ± Ecart-type (n = 2). ND : non détecté. * acides aminés essentiels.

2.1.3. Profil en acides gras :

Le tableau XII illustre les valeurs des acides gras (exprimés en % des acides gras totaux) du tilapia produit à Fat-Steppes (Ouest d'Algérie), du CEFRA et ceux de la littérature. Il reprend aussi leurs pourcentages en lipides totaux respectivement.

Un ensemble de 13 acides gras a été détectés et quantifiés par GC-MS. Le pourcentage de l'ensemble des acides gras polyinsaturés (AGPI) prédomine le profil lipidique du tilapia produit en Algérie. Il est estimé à 57,93 %, contre une proportion de 29,44 % en acides gras saturés (AGS) et 12,63 % en acides gras monoinsaturés (AGMI). L'acide palmitique (AGS) à 19,43 ± 0,44 % représente la proportion la plus importante de ce profil lipidique. Il est suivi par l'acide arachidonique (17,37 ± 1,16) et l'acide linoléique (13,55 ± 0,45) du groupe des n-6 des AGPI. L'acide élaïdique représente la proportion la plus importante du groupe des AGMI. Le rapport moyen de l'ensemble des n-3 / n-6 est de l'ordre de 0,46 ± 0,03.

RESULTATS

Tableau XII : Profil en acides gras et en lipides totaux du tilapia (*O. niloticus*) produit à Fat-Steppes comparé au tilapia produit au CEFRA et à ceux de la littérature (% des acides gras totaux).

Acides gras	Tilapia Algérie	Tilapia CEFRA	De Souza <i>et al.</i> 2007	Suloma <i>et al.</i> 2008	Elagba & Al-Sabahi 2011	Navarro <i>et al.</i> 2012	Dhanapal <i>et al.</i> 2012
Palmitique C16:0	19,43 ± 0,44	23,07 ± 0,03	14,8 ± 0,7	23,92 ± 0,40	24,23	24,64 ± 1,2	28,26 ± 0,27
Stearique C18:0	10,01 ± 0,32	8,21 ± 0,01	5,9 ± 0,5	9,23 ± 0,55	22,48	6,16 ± 0,22	8,41 ± 0,12
Σ AGS	29,44 ± 0,13	31,28 ± 0,02	23,5 ± 0,9	35,67 ± 0,24	64,24	37,27	46,62 ± 0,36
Palmitoleique C16:1n-7	1,38 ± 0,09	4,86 ± 0,31	1,6 ± 0,4	2,21 ± 0,45	12,63	4,34 ± 0,18	9,38 ± 0,02
Elaidique C18:1n-9	11,26 ± 0,32	13,08 ± 0,37	21,1 ± 1,6	3,33 ± 0,40	3,85	34,09 ± 1,33	20,65 ± 0,01
Σ AGMI	12,63 ± 0,47	17,94 ± 0,06	33,4 ± 1,1	12,00 ± 0,62	21,38	41,22	36,03 ± 0,04
Linoléique C18:2n-6	13,55 ± 0,45	8,46 ± 0,05	29,2 ± 1,6	1,43 ± 0,09	1,53	13,30 ± 0,62	9,23 ± 0,01
L γ -Linoléique C18:3n-6	1,73 ± 0,22	/	1,3 ± 0,1	0,41 ± 0,02	0,87	0,27 ± 0,02	/
Eicosadiénoïque C20:2n-6	2,11 ± 0,20	/	2,1 ± 0,3	0,19 ± 0,02	0,16	/	/
Eicosatriénoïque C20:3n-6	4,83 ± 0,02	5,01 ± 0,03	1,3 ± 0,1	0,50 ± 0,02	1,05	/	1,17 ± 0,01
Arachidonique C20:4n-6	17,37 ± 1,16	7,64 ± 0,01	4,0 ± 0,6	9,36 ± 0,47	/	/	2,05 ± 0,09
Σ n-6	39,60 ± 1,18	21,11 ± 0,07	43,1 ± 2,1	17,69 ± 0,26	4,69	13,57	12,19 ± 0,21
Lenoléique C18:3n-3	1,79 ± 0,25	/	1,2 ± 0,2	0,56 ± 0,08	/	0,60 ± 0,1	2,41 ± 0,02
Eicosapentaénoïque C20:5n-3	2,40 ± 0,32	4,79 ± 0,17	/	4,52 ± 0,42	/	0,51 ± 0,1	0,31 ± 0,02
Docosapentaénoïque C22:5n-3	3,88 ± 0,35	7,82 ± 0,17	0,5 ± 0,1	5,06 ± 0,43	/	/	0,77 ± 0,01
Docosahexaénoïque C22:6n-3	10,26 ± 0,33	17,07 ± 0,45	2,0 ± 0,5	16,27 ± 0,30	3,96	/	0,89 ± 0,02
Σ n-3	18,33 ± 0,59	29,68 ± 0,11	3,9 ± 0,6	27,07 ± 0,15	9,53	1,29	4,92 ± 0,02
Σ n-3 / Σ n-6	0,46 ± 0,03	1,41 ± 0,01	0,09 ± 0,01	1,53 ± 0,02	2,03	0,10 ± 0,01	0,40 ± 0,01
Σ AGPI	57,93 ± 0,59	50,78 ± 0,04	15,6 ± 2,0	44,76 ± 0,40	14,38	17,05	17,11 ± 0,23
Lipide totaux (%)	0,33 ± 0,03	1,78 ± 0,11	1,1	2,54 ± 0,27	/	/	/

23 acides gras ont été déterminés dans le tilapia produit en Algérie et au CEFRA. AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acide gras polyinsaturés ; / : non détecté ; CEFRA : Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (Tihange- Belgique).

RESULTATS

2.2. Etablissement du diagramme de production

Le diagramme de production (Figure 18) établi dans le cadre de notre travail, permet de distinguer 06 étapes successives depuis la reproduction des tilapias jusqu'à leur commercialisation. Les trois premières étapes (en rouge) représentent la phase *anté mortem* et les trois dernières étapes (en bleu) représentent la phase *post mortem*. La durée de chaque étape est mentionnée sur le diagramme. Les intrants qui interviennent dans le flux de production sont recensés et indiqués sur l'étape correspondante. Il s'agit de l'eau et des aliments d'élevage, les médicaments vétérinaires (antibiotiques et hormone), le filet de pêche, les caisses et la glace du conditionnement, le moyen de transport (camion frigorifique) et l'étalage lors de la commercialisation.

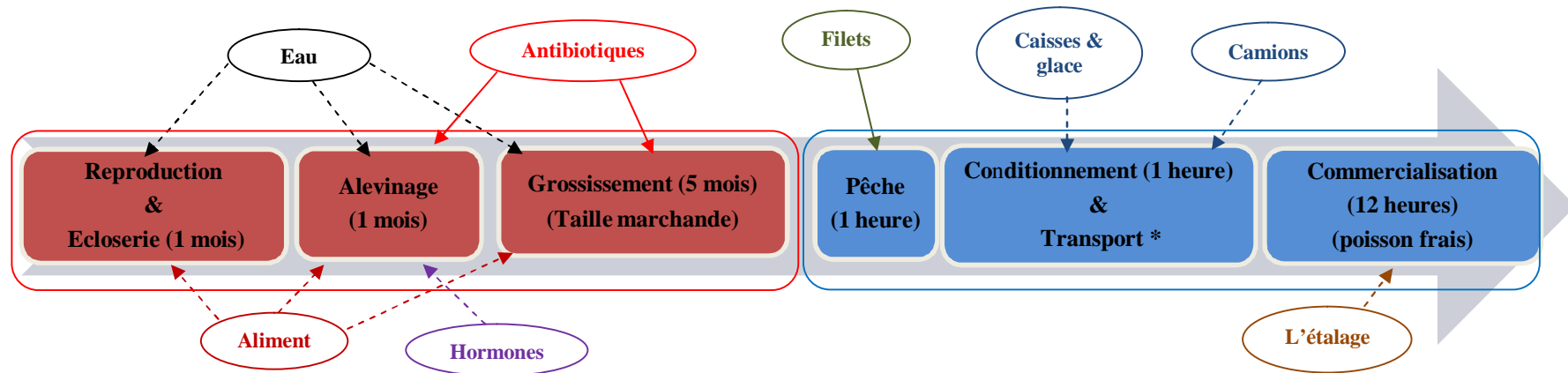


Figure 18 : Diagramme de production du tilapia "O. niloticus" selon la démarche HACCP (étape 4)

* La durée du transport dépendra de l'itinéraire pour se rendre au point de vente.

RESULTATS

II. SURVEILLANCE DES DANGERS PENDANT LA PHASE ANTE-MORTEM

1. Résidus d'antibiotiques :

1.1. Adaptation d'une méthode de screening microbiologique pour la détection de résidus de fluoroquinolones et de tétracyclines dans la chair de tilapia - mini validation

1.1.1. *Contrôle de qualité du test microbiologique :*

Lors de la préparation des milieux microbiologiques (gélose à pH 6,5), les contrôles négatifs (disque contenant 50 µl de méthanol) étaient bien négatifs, aucune zone d'inhibition n'a été décelée. Les contrôles positifs ont montrés les largeurs des zones d'inhibition suivantes : $9,81 \pm 0,91$ mm autour du disque 1 (contenant 50 µl de la solution standard intermédiaire d'antibiotique) et $9,54 \pm 0,94$ mm autour du disque 2 (contenant 50 µl de la solution standard intermédiaire d'antibiotique + 20 µl de NaOH à 1 %) pour l'acide oxolinique. $9,47 \pm 1,32$ mm autour du disque 1 et $3,58 \pm 1,56$ mm autour du disque 2 pour l'oxytétracycline.

1.1.2. *Etude préliminaire de la capacité de détection du test microbiologique (CCβ) :*

Les résultats des tests préliminaires, réalisés en triple, lors de l'application du protocole de Dang *et al.* (2010) sur des échantillons blancs (chair de tilapia non contaminé) dopés avec les huit antibiotiques d'intérêt sont repris dans le Tableau XIII.

Tableau XIII : Test préliminaire de la capacité de détection "CCβ" de huit antibiotiques dans la chair de tilapia en appliquant la méthode de Dang *et al.* (2010).

Antibiotique	LMR * (µg/kg)	Concentration testée		Largeur de la zone d'inhibition (mm) (n = 3)	
		(µg/kg)	Fraction de la LMR	Disque 1	Disque 2 (+ NaOH)
FLUOROQUINOLONES					
Acide oxolinique	100	95	0,95	$1,65 \pm 0,18$	$1,17 \pm 0,25$
Ciprofloxacine	100	95	0,95	$0,73 \pm 0,34$	$1,76 \pm 0,43$
Enrofloxacin	100	65	0,65	$1,34 \pm 0,48$	$3,50 \pm 0,29$
Fluméquine	600	80	0,13	$1,84 \pm 0,07$	0
TETRACYCLINES					
Oxytétracycline	100	75	0,75	$1,91 \pm 0,13$	0
Doxytétracycline	100	25	0,25	$1,73 \pm 0,10$	$1,62 \pm 0,62$
Chlortétracycline	100	25	0,25	$2,80 \pm 0,71$	0
Tétracycline	100	60	0,6	2,1	0
Blancs		0		0	0

*Règlement (EU) n°37/2010.

La capacité de détection du test microbiologique pour la famille des tétracyclines variait entre 0,25 fois la LMR (doxytétracycline) et 0,75 fois la LMR (oxytétracycline).

RESULTATS

Pour les fluoroquinolones les résultats étaient partagés. L'enrofloxacin et la fluméquine étaient détectés avec une capacité de détection de 0,65 fois la LMR et 0,13 fois la LMR respectivement. Quant à l'acide oxolinique et la ciprofloxacine la capacité de détection se situait au niveau de la LMR (0,95).

1.1.3. Optimisation de la capacité de détection du test microbiologique (CC β) :

Le tableau XIV reprend les résultats du test du screening microbiologiques après optimisation. C'est-à-dire, reconstitution de l'extrait final d'antibiotique dans 200 μ l de méthanol au lieu des 250 μ l de méthanol préconisés dans le protocole de base de Dang *et al.* (2010).

Tableau XIV : Détermination de la capacité de détection par la méthode microbiologique après adaptation.

Antibiotique	LMR *	Concentration testée		Largeur de la zone d'inhibition (mm) (n = 20)		Capacité de détection CC β exprimée en Fraction de la LMR
	(μ g/kg)	(μ g/kg)	Fraction de la LMR	Disque 1	Disque 2 (+ NaOH)	
FLUOROQUINOLONES						
Acide oxolinique	100	75	0,75	2,03 \pm 0,32	1,09 \pm 0,39	0,75
Ciprofloxacine	100	80	0,8	0	1,82 \pm 0,29	0,8
Enrofloxacin	100	30	0,3	0,60 \pm 0,17	1,85 \pm 0,19	0,3
Fluméquine	600	75	0,13	1,71 \pm 0,15	0	0,13
TETRACYCLINES						
Oxytétracycline	100	65	0,65	1,59 \pm 0,06	0	0,65
Doxytétracycline	100	15	0,15	1,86 \pm 0,20	0,4 \pm 0,37	0,15
Chlortétracycline	100	15	0,15	1,98 \pm 0,33	0	0,15
Tétracycline	100	35	0,3	1,69 \pm 0,16	0	0,3
Blancs		0	0	0	0	

n = 20, moyenne et écart-type sont calculés pour chaque antibiotique.

*Règlement (EU) n°37/2010.

La capacité de détection "CC β " de la méthode est inférieure aux LMR pour chacun des huit antibiotiques testés. Néanmoins, cette capacité est plus importante pour les tétracyclines et varie entre 0,15 et 0,65 fois la LMR. Pour les fluoroquinolones, la CC β varie entre 0,3 et 0,8 fois la LMR.

On constate que la capacité de détection a été améliorée par rapport aux tests préliminaires d'un minimum de 0,05 fois la LMR pour la fluméquine à 0,3 fois la LMR pour l'enrofloxacin. Cette dernière a été améliorée d'un peu plus que deux fois (la CC β est passée de 0,65 fois la LMR à 0,3 fois la LMR). Quant à la CC β de l'acide oxolinique, elle est passée de 0,95 fois la LMR à 0,75 fois la LMR.

RESULTATS

La Figure 19, illustre la différence de résultat observée lors de l'analyse de deux extraits de chair de tilapia fortifiée avec 100 µg/kg d'acide oxolinique repris respectivement dans 250 µl (volume préconisé dans le protocole de Dang *et al.*, 2010) et 200 µl (volume optimisé) de méthanol, et confirme l'amélioration de la sensibilité du test.

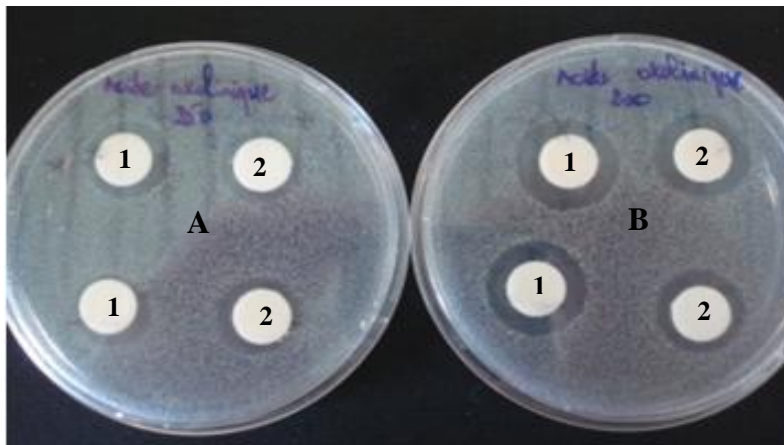


Figure 19 : Résultats du screening microbiologique (pH 6) de chair de tilapia contaminée avec 100 µg/kg d'acide oxolinique.

A: extrait reconstitué dans 250 µl de méthanol, B: extrait reconstitué dans 200 µl de méthanol, 1 : 50 µl d'extrait, 2 : 50 µl d'extrait + 20 µl NaOH à 1 %.

1.1.4. Evaluation des paramètres de performance de la méthode microbiologique :

Les résultats des paramètres de performance du screening microbiologique sont représentés dans le Tableau XV. La méthode optimisée démontre une spécificité de 100 %, une sensibilité d'un minimum de 95 % et une exactitude d'un minimum de 97,5 % pour l'enrofloxacin, la fluméquine et la doxycycline. Pour les autres antibiotiques et en particulier l'acide oxolinique, toutes les performances sont de 100 %.

Tableau XV: Performances de la méthode microbiologique adaptée.

Antibiotique	LMR * (µg/kg)	Capacité de détection CCβ (fraction de la LMR)	Nombre de Positifs N ⁺	Nombre de Négatifs **** N ⁻	Performance de la méthode		
					Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Exactitude (%)
FLUOROQUINOLONES							
Acide oxolinique	100	0,75	20	20	100	100	100
Ciprofloxacine **	100	0,8	20	20	100	100	100
Enrofloxacin **	100	0,3	19	20	100	95	97,5
Fluméquine	600	0,17	19	20	100	95	97,5
TETRACYCLINES							
Oxytétracycline	100	0,65	20	20	100	100	100
Doxytétracycline ***	100	0,15	19	20	100	95	97,5
Chlortétracycline	100	0,15	20	20	100	100	100
Tétracycline	100	0,3	20	20	100	100	100

* Règlement (UE) n° 37/2010. ** 100 µg/kg pour la somme de ciprofloxacine et d'enrofloxacin.

*** LMR pour la viande (pas de LMR pour le poisson).

**** mesurés sur 20 échantillons "blancs".

RESULTATS

1.2. Mise au point d'une méthode de confirmation chromatographique de l'acide oxolinique par HPLC-UV

Une méthode LC-MS était déjà disponible au laboratoire d'analyse des denrées alimentaires "LADA" pour l'analyse des quinolones au moyen d'un équipement LC-MS de type triple-quad (Danyi *et al.*, 2010).

Dans ce travail, nous avons voulu développer une méthode LC-UV, plus accessible pour un laboratoire de contrôle algérien, qu'une méthode nécessitant la spectrométrie de masse.

Pour ce faire, nous avons utilisé un équipement HPLC disponible au "LADA", muni d'un détecteur UV, mais également d'un détecteur par spectromètre de masse (de type "ion trap"), ce qui nous a permis de tester en parallèle les deux types de détection sur le même extrait d'échantillon injecté en LC.

1.2.1. *Optimisation de la méthode de détection LC-UV-MS :*

Le résultat de la linéarité a été vérifié en se basant sur les coefficients de détermination R^2 , calculés par régression linéaire sur la moyenne de trois courbes. Le résultat moyen obtenu a été $R^2 = 0,999$ pour la détection UV et $R^2 = 0,995$ pour la détection MS (Figure 20). Ce résultat de linéarité indique que l'analyse quantitative fonctionne bien pour les deux modes de détection (UV et MS).

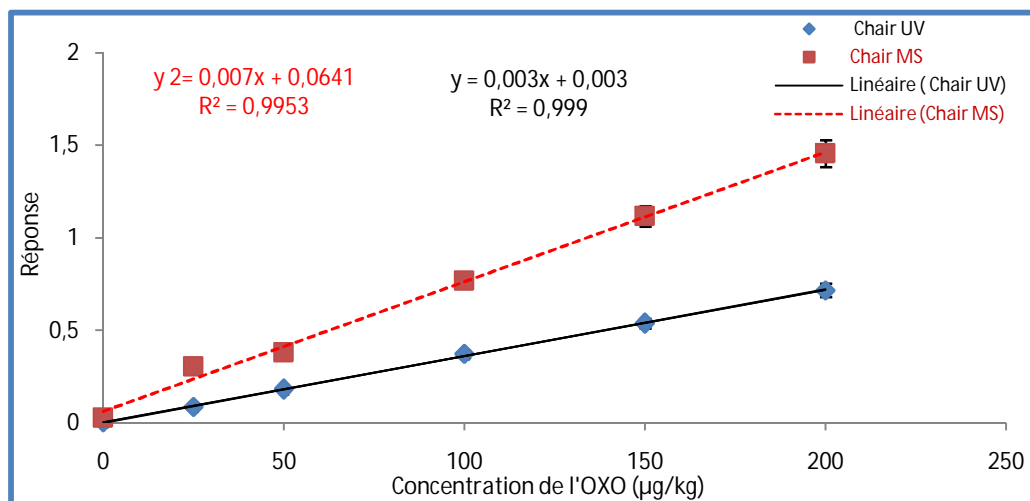


Figure 20 : Courbes de calibration moyennes réalisées à partir de la chair du tilapia fortifiée avec des concentrations croissantes en acide oxolinique, détectée par UV et MS.

Un chromatogramme (MS) repris dans la Figure 21 montre le pic de l'acide oxolinique et le standard interne (loméfloxacin) à des temps de rétentions respectifs de 7,55 min et 5,47 min.

RESULTATS

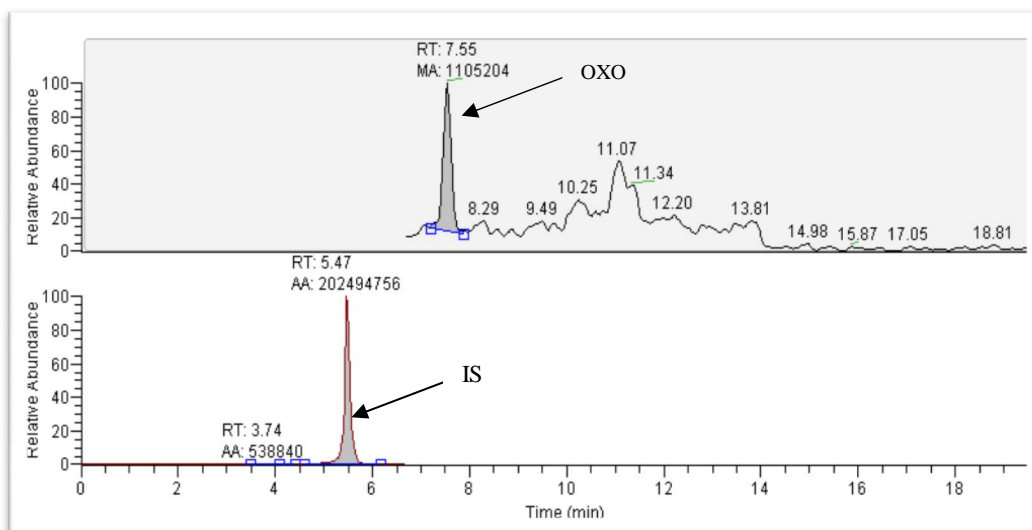


Figure 21: Chromatogramme obtenu lors de l'analyse par LC-MS de la chair du tilapia fortifiée avec de l'acide oxolinique à la concentration de LMR/20 (5 µg/kg).

OXO : acide oxolinique, IS : standard interne.

Nous avons constaté après un essai préliminaire sur des tilapias du lot 1 de l'expérience de contamination par l'acide oxolinique, que les échantillons sont très concentrés en acide oxolinique. De telles concentrations encrassent le spectromètre de masse très rapidement. Nous avons donc opté pour la seule détection UV, compatible avec les quantités injectées et avec les équipements d'analyse dans les laboratoires algériens.

1.2.2. Evaluation des paramètres de performance de la méthode LC-UV :

Les résultats repris dans le Tableau XVI, démontrent que les valeurs de la **justesse** calculées pour les cinq concentrations en acide oxolinique dans la chair se retrouvent dans l'intervalle toléré. Par contre, trois concentrations (25, 50 et 100 µg/kg) parmi les cinq concentrations en acide oxolinique testées dans le sérum sont hors intervalle.

Les résultats de l'écart-type relatif obtenus pour la moyenne des concentrations obtenues sur les trois séries d'analyses sont illustrés dans le Tableau XVI. Il s'avère que pour les deux matrices, toutes les valeurs calculées de la variance (RSD) sont inférieures à **23 %**.

RESULTATS

Tableau XVI : Justesse et fidélité de la méthode LC-UV (n = 3).

	Concentration théorique (µg / kg)	Concentrations calculées (µg / kg)			Moyenne	SD	R.S.D % (Fidélité *)	Justesse % **
		Courbe 1	Courbe 2	Courbe 3				
Chair	25	21	25	32	26	5,67	21,87	+ 3,7
	50	53	43	57	51	7,17	14,08	+ 1,78
	100	101	101	106	103	2,84	2,77	+ 2,72
	150	162	145	122	143	19,99	13,98	- 4,71
	200	190	211	187	196	12,98	6,62	- 1,93
Sérum	25	27	43	37	36	7,89	22,02	+ 43,41
	50	52	69	46	56	11,61	20,88	+ 11,15
	100	85	74	62	74	11,59	15,7	- 26,16
	150	141	156	132	143	12,25	8,57	- 4,68
	200	205	173	192	190	16,34	8,61	- 5,08

* Fidélité déterminée en conditions de reproductibilité R.D.S (%) < 23 % (EC, 2002).

** Intervalle de Justesse: - 20 % à + 10 % (EC, 2002).

✚ **Limite de quantification (LOQ)** : Nous avons fixé arbitrairement la limite de quantification comme étant la concentration correspondant au 1^{er} point de la courbe de calibration (hors 0), à savoir MRL/20 (c'est-à-dire 5 µg/kg).

✚ **Limite de détection (LOD)** : Nous avons considéré arbitrairement cette valeur égale à LOQ/2 ce qui implique que pour notre méthode la valeur du LOD est égale à 2,5 µg/kg dans les deux matrices.

✚ La linéarité a été vérifiée en se basant sur les coefficients de détermination R^2 , calculée par régression linéaire. Le résultat moyen obtenu pour trois courbes de calibration est $R^2 = 0,999$ pour la chair et $R^2 = 0,989$ pour le sérum. On constate que les deux courbes moyenne se superposent, ce qui indique que l'effet matrice est similaire dans le cas de la chair et dans le cas du sérum (Figure 22).

RESULTATS

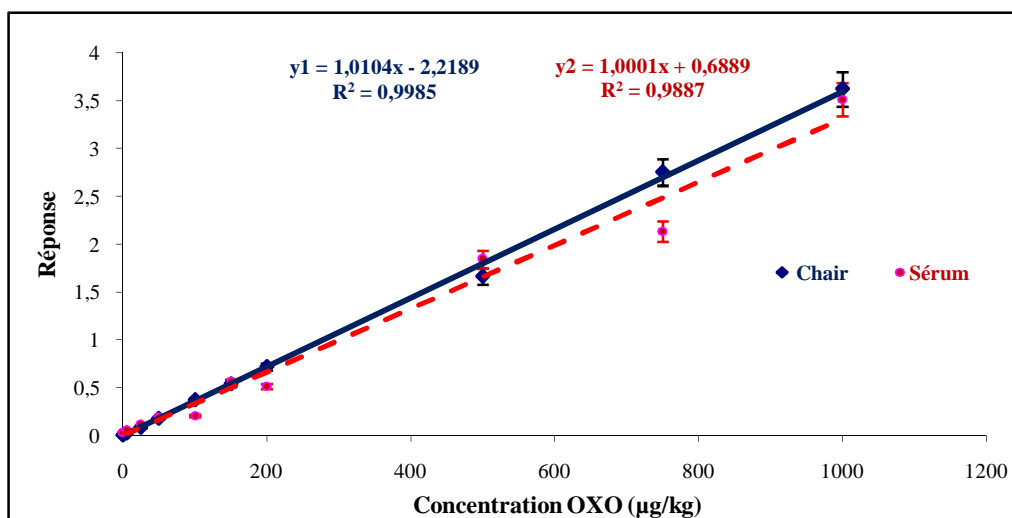


Figure 22: Courbes de calibration moyennes réalisées à partir de sérum et de la chair du tilapia dopé avec des concentrations croissantes en acide oxolinique.

La moyenne de trois répétitions est calculée pour chaque matrice. L'équation de la régression linéaire et le coefficient de détermination (R^2) de chaque matrice est indiquée pour chaque courbe moyenne. La réponse = Aire de l'analyte / l'aire du standard interne (IS).

Le Tableau XVII reprend les valeurs du temps de rétention relatif (TRR) de l'OXO mesuré dans les deux lots analysés de chair et de sérum de tilapia. Pour la première matrice, tous les résultats sont inférieurs à l'écart toléré de 2,5 %. Par contre dans le sérum, 4 points du deuxième lot sont hors intervalle.

Tableau XVII: Ecart du TRR de l'acide oxolinique dans la chair et le sérum du tilapia au TRR moyen de la courbe de calibration.

Echantillon	Ecart entre le TRR de l'OXO mesuré dans l'échantillon et le TRR moyen de l'OXO de référence (%)			
	Lot 1 Chair	Lot 2 Chair	Lot 1 Sérum	Lot 2 Sérum
1	-0,94	0,04	-0,63	-2,24
2	-1,16	0,13	-0,77	-1,14
3	0,11	-0,1	-1,6	-3,22
4	-1	-0,08	0,47	0,19
5	0,22	-0,35	0,56	-1,25
6	-0,21	-0,38	-0,73	-1,64
7	-0,56	-0,33	1,02	-2,84
8	-1,03	-0,52	0,21	-2,97
9	-1,35	0,81	-0,72	0,24
10	-0,9	0,51	0,73	-2,71
11	-1,15	-0,11	0,2	-0,53
12	-0,76	-0,12	0,65	-0,09
13	-0,87	-0,06	0,78	0,3
14	-0,67	-0,11	0,07	-0,03
15	-0,57	-0,11	0,57	0,16
16	-0,37	0,02	-0,2	0,21

RESULTATS

Le temps de rétention de l'acide oxolinique fluctue entre 6,95 et 7,46 min et celui du S.I entre 9,28 et 9,73 min.

La Figure 23 montre un chromatogramme obtenu lors de l'analyse par HPLC-UV de chair de tilapia dopé à MRL/2 (50 µg/kg) ; sur celui-ci les temps de rétention de l'acide oxolinique et du S.I y sont illustrés.

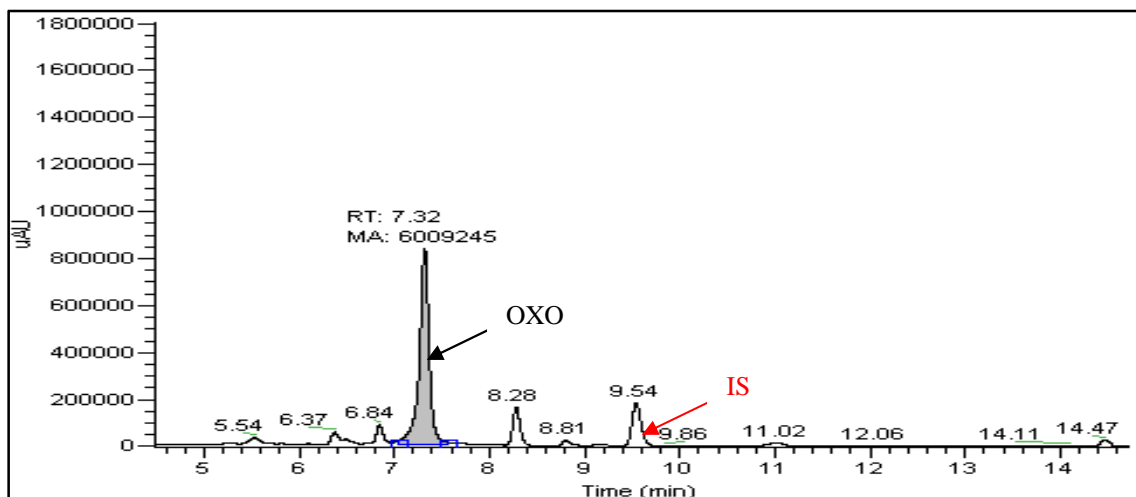


Figure 23 : Chromatogramme obtenu lors de l'analyse par HPLC-UV de la chair de tilapia contenant de l'acide oxolinique à une concentration de 50 µg/kg.

La figure 24 illustre la présence du pic du standard interne et l'absence du pic de l'acide oxolinique lors de l'analyse par HPLC-UV de chair de tilapia témoin. On constate qu'au temps de rétention de l'acide oxolinique (~ 7,40 min) qu'aucun pic n'est présent dans le chromatogramme alors que le pic du standard interne est bien visible (~ 9,46 min).

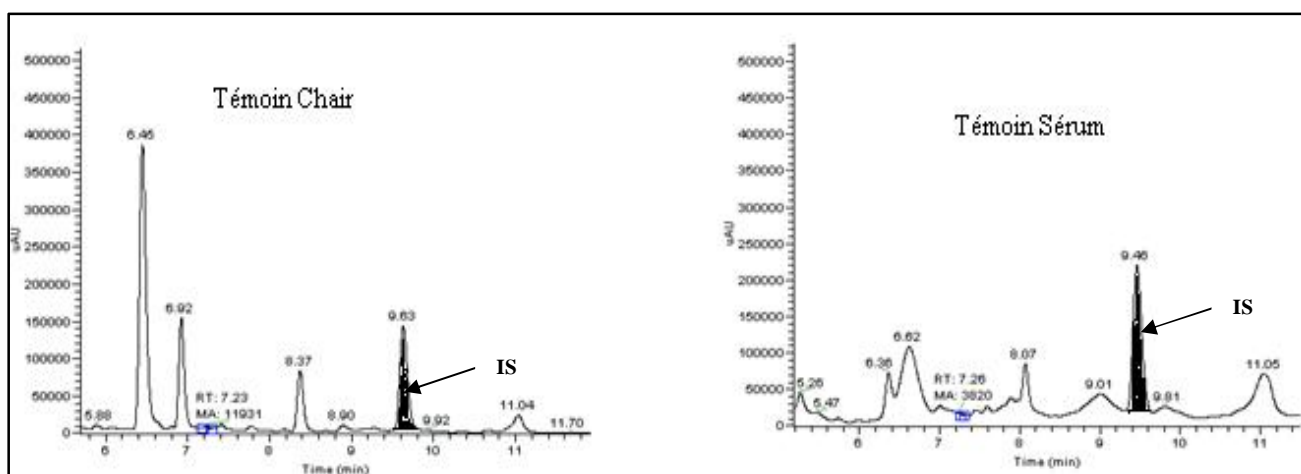


Figure 24 : Chromatogrammes HPLC-UV des témoins de chair et de sérum de tilapia.

RESULTATS

1.3. Analyse des échantillons de tilapia contaminés par l'acide oxolinique

1.3.1. *Caractéristiques des deux lots de Tilapia contaminés par de l'acide oxolinique :*

Les échantillons de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) préalablement contaminés par l'acide oxolinique dans le laboratoire *AQUABIOR* se caractérisent par :

✚ un poids moyen de $92,44 \pm 25,42$ g pour le premier lot et de $79,19 \pm 19,43$ g pour le second ($n = 80$).

✚ la biomasse du premier lot était de ~ 7400 g au début de l'expérience et elle diminuait progressivement de ~ 450 g (poids moyen * 5 échantillons) à chaque point de prélèvement jusqu'à la fin du traitement, et celle du deuxième lot était de ~ 6400 g au départ.

1.3.2. *Screening microbiologique :*

✚ Les résultats du screening microbiologique des vingt échantillons témoins (10 de chaque lot non contaminé) ont été tous négatifs, aucune zone d'inhibition n'a été décelée (Figure 25).

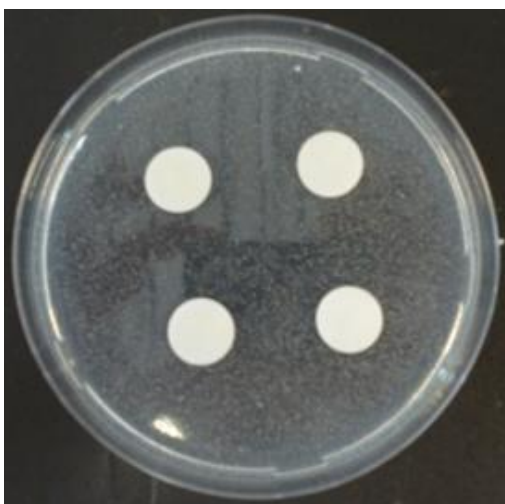


Figure 25: Résultat du screening microbiologique des témoins de la chair du tilapia : exemple d'une boîte parmi les 20 tests.

✚ Les résultats du screening microbiologique obtenus à partir des échantillons de chair de tilapia contaminés avec l'acide oxolinique sont représentés sous forme de courbes de cinétique d'élimination dans la Figure 26 et Figure 27 correspondant respectivement au lot 1 et au lot 2.

Les résultats du screening microbiologique de la chair de tilapia provenant du 1^{er} lot de poissons contaminés (Figure 26) montrent une saturation de la réponse à partir de 6 heures après le début du traitement, saturation qui persiste jusqu'à un jour (jour 7) après l'arrêt du traitement.

RESULTATS

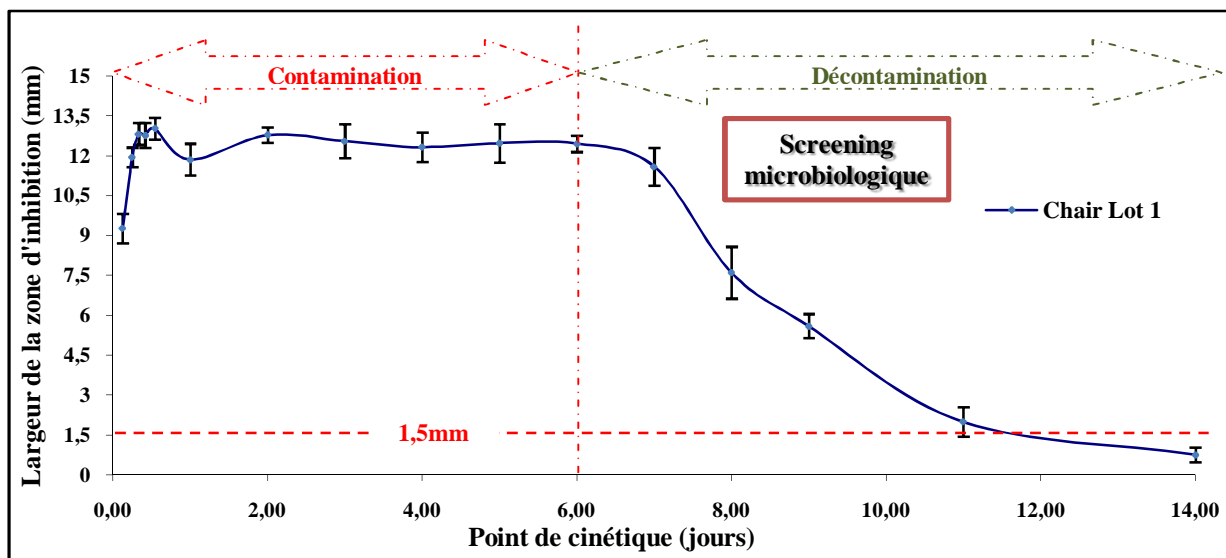


Figure 26 : Résultat du screening microbiologique de la chair du tilapia du lot 1 de l'expérience de contamination par de l'acide oxolinique. Moyenne \pm écart type (n = 5).

Cette saturation de la réponse s'explique par des niveaux très élevés en acide oxolinique dans la chair de tilapia, niveaux auxquels la relation dose-réponse dans le test microbiologique n'est plus du tout proportionnelle.

La réponse commence à décroître à partir du 2^{ème} jour après l'arrêt du traitement et passe sous le seuil de positivité du test (largeur de la zone d'inhibition = 1,5 mm) 5 jours après l'arrêt du traitement (jour 11).

Le profil général de réponse est similaire dans le deuxième lot de poissons traités à l'acide oxolinique mais les niveaux de concentrations sont légèrement plus élevés et ne descendent pas sous le seuil de positivité du test 7 jours après l'arrêt du traitement. Le temps de 8 jours (jour 14) après l'arrêt du traitement n'a pas été testé, mais il est très vraisemblable que la réponse du test microbiologique reste positive au jour 14 dans ce lot 2 (Figure 27).

RESULTATS

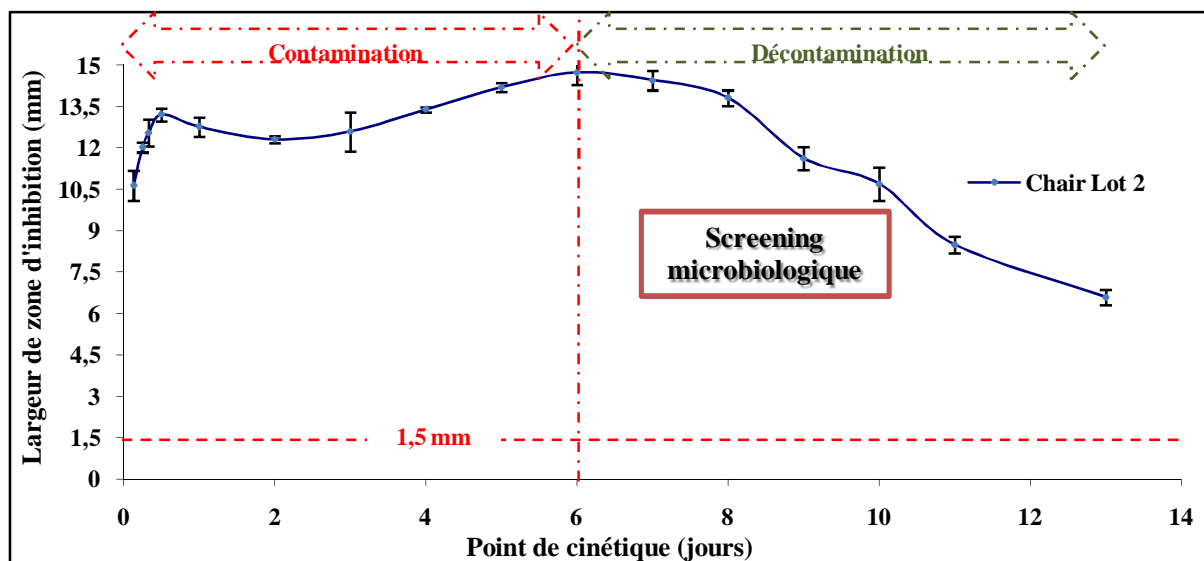


Figure 27 : Résultat du screening microbiologique de la chair du tilapia du lot 2 de l'expérience de contamination par de l'acide oxolinique. Moyenne \pm écart type (n = 5).

Le calcul de la moyenne de la largeur des zones d'inhibition des 80 échantillons traités dans chaque lot et qui ont été inoculés sur les deux disques, révèle que les valeurs obtenues sont très proches (disque 1 contenant juste l'extrait et le disque 2 contenant 20 μ l de NaOH à 1 % en plus). La moyenne de la largeur des zones d'inhibition du lot 1 est de 10,11 mm pour le disque 1 et de 9,50 mm pour le second disque. Quant au lot 2, la moyenne de la largeur des zones d'inhibition est de 12,14 mm pour le disque 1 et 11,59 mm pour le disque 2. En se basant sur ce constat (différence non significative entre les largeurs des deux disques), un seul disque pourrait être utilisé pour le screening microbiologique spécifique de l'acide oxolinique sur le milieu pH 6ensemencé avec *Bacillus subtilis*.

1.3.3. Quantification de la concentration en acide oxolinique dans la chair et le sérum du tilapia par LC-UV :

Les cinq échantillons prélevés à chaque point de cinétique ont été homogénéisés en un seul pool pour l'analyse chromatographique. Pour mieux illustrer la cinétique d'accumulation et d'élimination de l'acide oxolinique dans la chair et le sérum de tilapia, les deux phases (contamination et décontamination) ont été séparées graphiquement dans la Figure 27 et Figure 28 et chaque lot a été traité à part.

Les profils de concentrations en acide oxolinique dans la chair sont semblables, à la fois pour la phase d'accumulation et la phase d'élimination, avec des niveaux de concentrations, exprimées en μ g/kg, inférieurs dans le sérum par rapport à la chair (lot 1, Figure 28).

RESULTATS

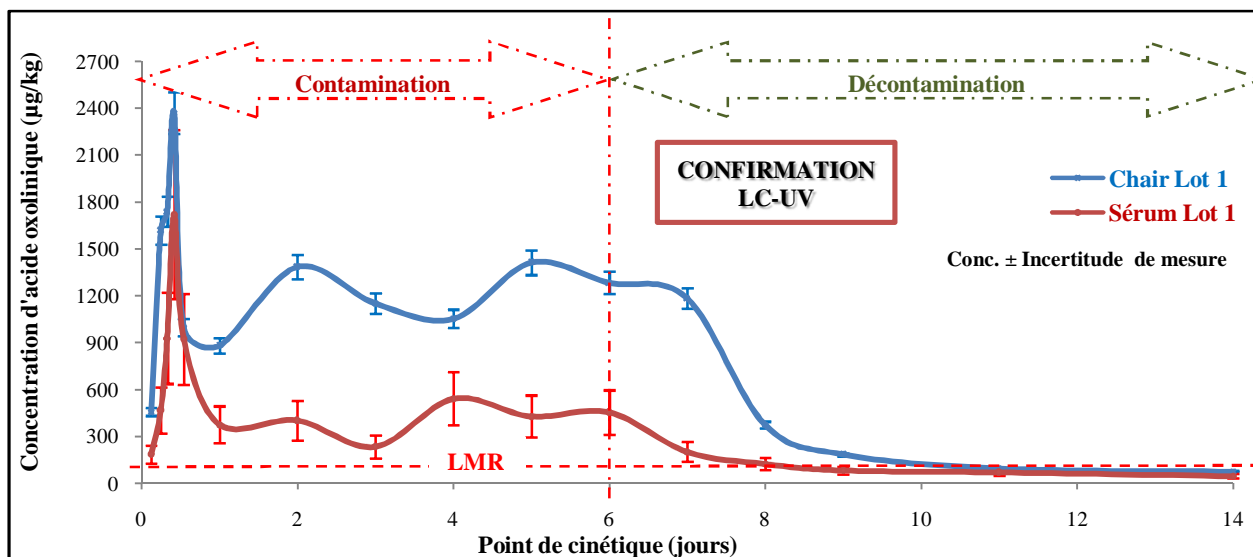


Figure 28 : Concentration en acide oxolinique ($\mu\text{g}/\text{kg}$), déterminée par LC-UV, dans la chair et le sérum des tilapias issus du lot 1 de l'expérience de contamination.

Dès la 3^{ème} heure qui suit la première prise de l'aliment médicamenteux par voie orale, les concentrations en acide oxolinique dans les deux matrices sont élevées ($458 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans la chair et $184 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans le sérum pour le lot 1 de poissons). Ces concentrations augmentent rapidement pour atteindre un pic à la 10^{ème} heure avec des valeurs de l'ordre de $2370 \mu\text{g}/\text{kg}$ et $1722 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans la chair et le sérum respectivement. Puis, elles rechutent rapidement à H24 pour fluctuer jusqu'au dernier jour de traitement (jour 6) avec des valeurs de $1413 \mu\text{g}/\text{kg}$ et $429 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans la chair et le sérum respectivement (lot 1, Figure 27). Dans la phase de décontamination, dès le premier jour (jour 7) les concentrations baissent rapidement jusqu'au 4^{ème} jour après l'arrêt du traitement (jour 10) pour atteindre $82 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans le sérum et $184 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans la chair.

Un plateau se dessine en dessous de la LMR aux deux derniers points de prélèvement J11 et J14 les valeurs respectives détectées vers la fin sont de $77 \mu\text{g}/\text{kg}$ et $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans la chair et le sérum (Figure 28).

Le profil général de la cinétique d'élimination de l'acide oxolinique dans le deuxième lot de poissons ressemble à celui produit dans le premier lot avec quelques nuances. Des concentrations faibles sont détectées dans la première phase à 3 heures après la première antibiothérapie avec des valeurs de l'ordre de $113 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour le sérum et $1342 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour la chair. Les concentrations sont ascendantes assez rapidement dans les deux matrices pour atteindre un pic à H12 à une valeur de $4720 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour la chair et $1561 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour le sérum. La concentration sérique s'abaisse rapidement à H 24 à une valeur de $364 \mu\text{g}/\text{kg}$ puis remonte progressivement jusqu'au dernier jour de traitement (jour 6) où la concentration est de

RESULTATS

1738 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Quant à la concentration dans la chair, elle diminue jusqu'au 2^{ème} jour de traitement à une valeur de 2378 $\mu\text{g}/\text{kg}$ puis remonte à nouveau jusqu'au 4^{ème} jour et atteint 4012 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour diminuer à nouveau à une valeur de 3593 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au 5^{ème} jour après le traitement. Curieusement, la concentration en acide oxolinique remonte à nouveau dans la chair au 6^{ème} jour après le début du traitement (Figure 29).

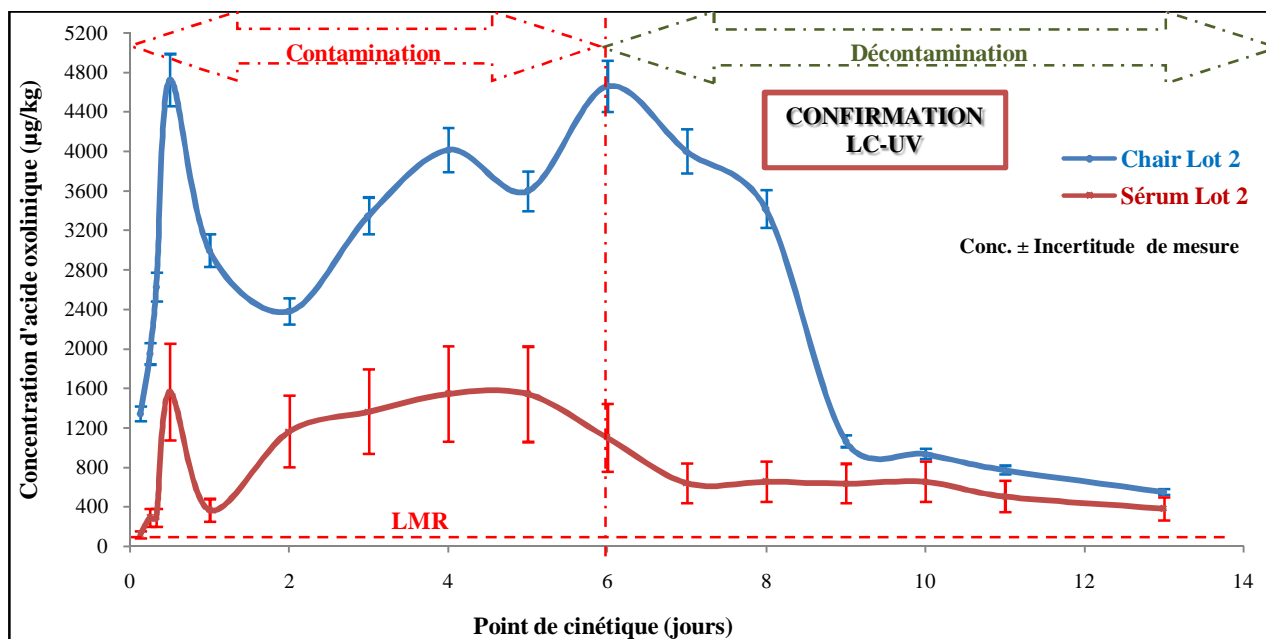


Figure 29 : Concentration en acide oxolinique ($\mu\text{g}/\text{kg}$), déterminée par LC-UV, dans la chair et le sérum des tilapias issus du lot 2 de l'expérience de contamination.

Dans la deuxième phase (Décontamination) les concentrations descendent rapidement jusqu'à 1063 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au 8^{ème} jour pour la chair et 639 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour le sérum au 7^{ème} jour. La concentration sérique est sous forme de plateau jusqu'au dixième jour après le début de l'expérience puis diminue progressivement jusqu'à une concentration de 377 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au 7^{ème} jour post traitement. Quant à la concentration dans la chair, elle diminue progressivement jusqu'à 549 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au dernier jour de l'expérience (J13). En comparaison avec le premier lot ces résultats montrent que le deuxième lot était plus concentré.

D'après les résultats obtenus dans le lot 1, en conditions réelles d'élevage, le délai d'attente à respecter après l'arrêt du traitement serait donc de 8 jours.

Malheureusement, ces conclusions ne sont pas confirmées par les résultats obtenus par le lot 2, où il semblerait qu'un délai d'attente plus long soit nécessaire. Plusieurs replicats réalisés de manière indépendante seraient encore nécessaires pour le délai d'attente.

RESULTATS

Cette différence de concentrations entre les deux lots nous permet cependant de démontrer que la stratégie analytique envisagée (screening microbiologique suivi d'une identification et quantification par LC-UV) fonctionne pour le monitoring des résidus d'acide oxolinique dans la chair de tilapia (*Oreochromis niloticus*). En effet, un résultat inférieur au seuil de positivité en screening est bien inférieur à la LMR lorsque l'analyse est réalisée par HPLC-UV et vis-versa (Figure 30).

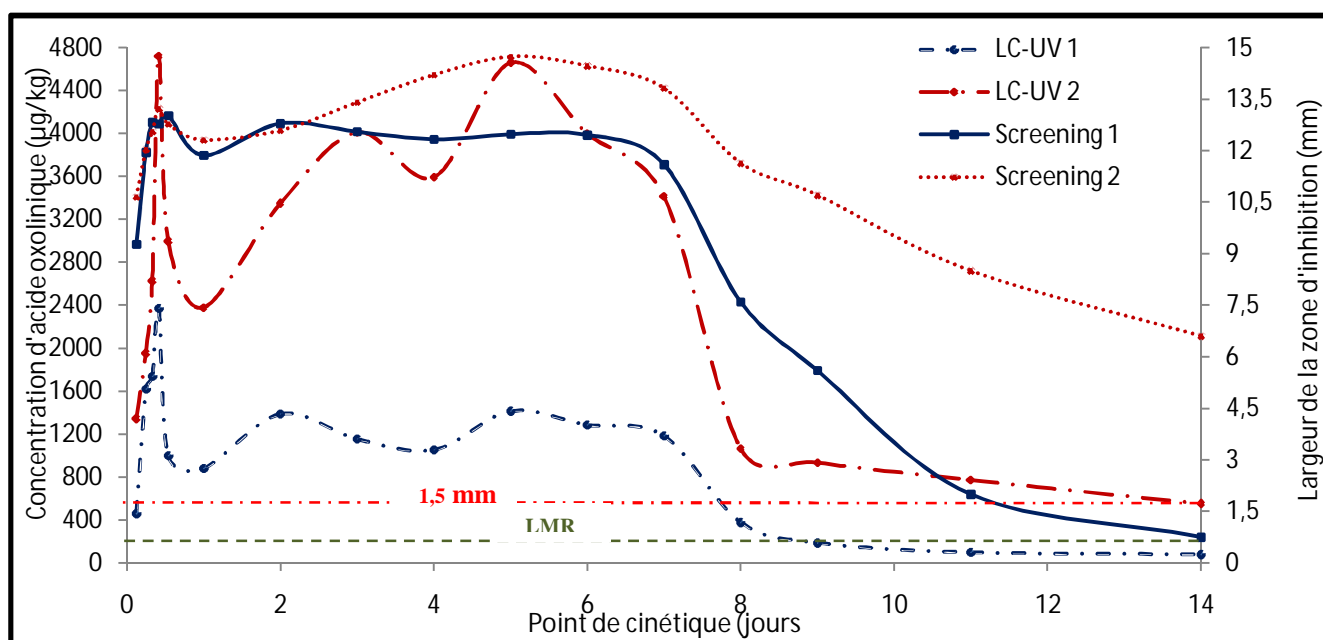


Figure 30 : Corrélation entre les résultats du screening et de l'analyse LC-UV des tilapias du lot 1 & lot 2 issus de l'expérience de contamination avec l'acide oxolinique.

1.3.4. Analyse statistique des résultats des résidus d'acide oxolinique

L'analyse statistique de type GLM (General Linear Model) et la régression quadratique (SAS, 2001) des résultats obtenus lors d'analyse des deux lots de tilapias contaminés à l'acide oxolinique nous révèle que :

- les résultats du screening microbiologique dans les deux lots ont été influencés par le temps d'échantillonnage, le taux de nitrites (lot 1 : 0,39 - 0,92 mg/l, lot 2 : 0,39 - 1,29 mg/l), le taux de nitrates (lot 1 : 5,35- 45,19 mg/l, lot 2 : 5,35 - 146,19 mg/l) et à moindre degré le taux d'ammoniac (0,33 -4,01 mg/l).
- l'analyse statistique nous révèle que les concentrations sériques de l'acide oxolinique ont été influencées par le taux des nitrates.
- Les résultats de la comparaison entre les deux lots de tilapias contaminés nous révèlent qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux lots ($P < 0,05$) pour les trois paramètres analysés (screening, LC-UV chair et LC-UV sérum).

RESULTATS

Enfin, la corrélation (test de Pearson) entre les deux méthodes d'analyse et entre les trois résultats (screening, HPLC-chair et HPLC-sérum) ont démontré qu'il existe une corrélation significative et positive entre les deux méthodes d'analyse dont les valeurs de Rho respectifs sont :

- ✓ Rho = 0,62 entre les résultats du screening microbiologique et ceux de la méthode HPLC-chair.
- ✓ Rho = 0,55 entre les résultats du screening microbiologique et ceux de la méthode HPLC-sérum.
- ✓ Rho = 0,56 entre les résultats de la méthode HPLC-chair et ceux de l'HPLC-sérum.

2. *17 α -méthyle testostérone (MT)* :

2.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau

Les valeurs moyennes enregistrées des différents paramètres physico-chimiques de l'eau des deux circuits fermés utilisés indépendamment pour les lots traités et le lot témoin sont acceptables et favorables pour la croissance des tilapias (*O. niloticus*). Les valeurs moyennes enregistrées ont été : $27 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$ pour la température, $6,77 \pm 0,56$ mg/l pour l'oxygène dissous, $0,89 \pm 0,75$ mg/l pour les nitrites, $0,45 \pm 0,30$ mg/l pour l'ammoniac et $7,87 \pm 0,09$ pour le pH.

2.2. Taux de mortalité

Au cours de l'expérience, le taux de survie a été également déterminé dans les quatre lots expérimentaux. On constate que le traitement hormonal n'avait pas d'impact sur la survie des poissons et un pourcentage de 100 % a été perçu dans l'ensemble des lots expérimentaux (lots traités et lot témoin).

2.3. Effet androgénique de la MT sur le sexe des tilapias (*O. niloticus*)

Les résultats du squash gonadique révèlent une moyenne de $97,78 \pm 1,54$ % de mâles et $2,22 \pm 1,54$ % de femelles dans les lots traités contre une moyenne assez équilibrée dans le lot témoin (non traité) (48,57 % mâles et 51,43 femelles) (Figure 31).

Le test de Chi-2 (χ^2) révèle une différence statistique significative ($P < 0,001$) du sexe ratio entre les lots traités et le contrôle.

RESULTATS

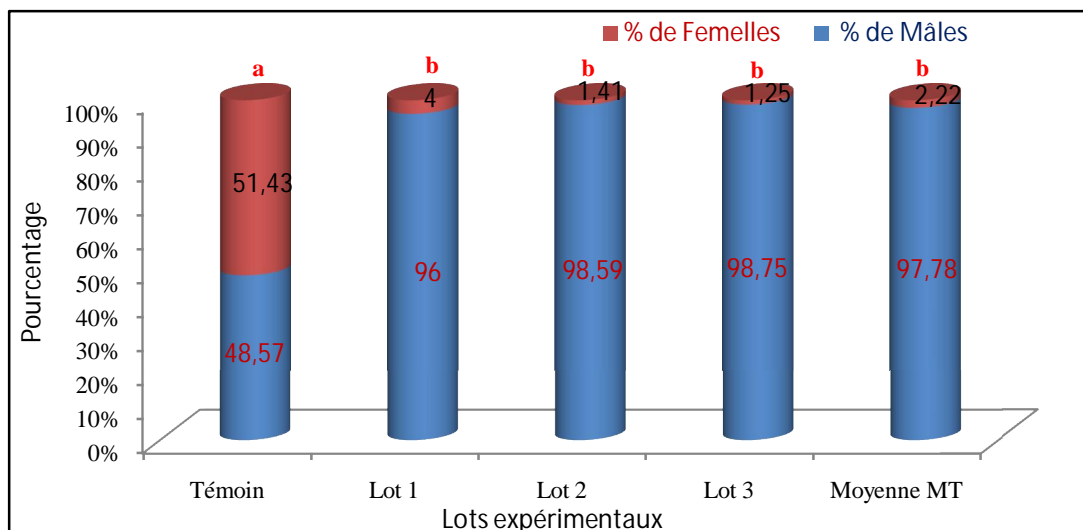


Figure 31 : Résultat du sexage des lots expérimentaux de juvéniles de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) suite à une inversion sexuelle à laméthyle testostérone.

Les valeurs marquées par des lettres similaires ne sont pas significativement différentes ($P < 0,001$). Lots traités : Moyenne ($n = 3$), témoin = 1 lot.

2.4. Résidus de la MT dans la chair de tilapia et à partir de l'eau rejetée

2.4.1. *Optimisation du protocole d'extraction de la MT :*

Après des tests préliminaires avec la méthode classique décrite pour les tissus et les urines dans le kit ELISA, le procédé d'extraction a été optimisé pour améliorer le rendement d'extraction des matrices étudiées (eau, chair et aliment). Les valeurs du rendement d'extraction après modification sont 55 % à partir de la chair du poisson, 73,85 % à partir de l'aliment et 85 % à partir de l'eau. Les paramètres de performances de la méthode d'extraction optimisée sont satisfaisants en termes de reproductibilité et de linéarité ($R^2 = 0,995$) comme illustré dans la Figure 32. Les limites de détection respectives (LOD) dans l'eau et dans la chair sont 0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et 0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les limites de quantification respectives dans l'eau et dans la chair (LOQ) sont 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et 0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

RESULTATS

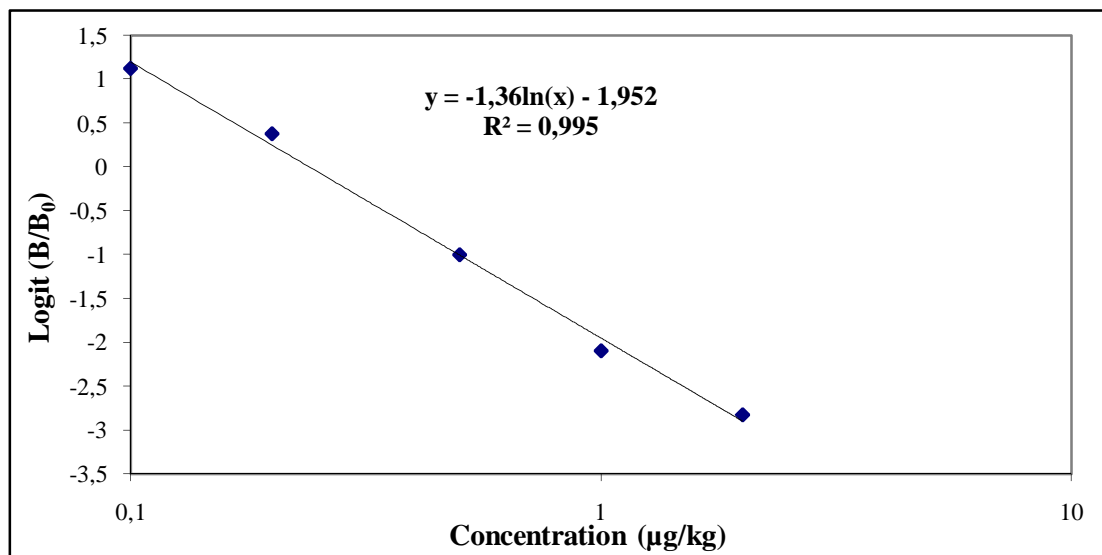


Figure 32 : Courbe de calibration de la 17 α -méthyle testostérone du test ELISA.

2.4.2. Analyse des échantillons :

Les résultats exprimés dans la Figure 33 représentent les valeurs des concentrations détectées par le test ELISA chez les poissons traités après soustraction des valeurs des concentrations en MT physiologique des témoins correspondants. Sachant que pour les sept prélèvements réalisés, sept échantillons de témoins ont été prélevés en parallèle dans les mêmes conditions d'élevage. Il ressort à partir de ce graphique (Figure 38) que la concentration moyenne de la MT est infime (1,56 $\mu\text{g/kg}$) dès le premier prélèvement (un jour après l'arrêt du traitement). Cette concentration reste statistiquement inchangée ($p < 0,05$) pendant les 15 premiers jours (0,61 $\mu\text{g/kg}$). Ensuite, elle diminue significativement ($p < 0,05$) et atteint 0,09 $\mu\text{g/kg}$ (seuil de détection du test ELISA) au bout d'un mois de cessation du traitement hormonal. Elle demeure statistiquement ($p < 0,05$) inchangée jusqu'à la fin de l'expérimentation (3 mois post-traitement). On constate qu'au bout de deux mois après la fin du traitement, la MT n'est plus décelable par le test ELISA ($< \text{LOD}$).

✚ L'analyse des échantillons réels issus de Fat-Steppes (Algérie), révèle que tous les échantillons sont négatifs par le test ELISA signifiant que les concentrations de la MT sont inférieures au seuil de détection de la méthode ELISA ($< 0,09 \mu\text{g/kg}$).

✚ Les résultats obtenus à partir de l'analyse des trois échantillons d'aliment médicamenteux (préparé à 65 mg/kg d'aliment) confirment bien la stabilité et la bonne homogénéisation de l'alimentation médicamenteuse utilisée dans cette étude. Les valeurs détectées par le test ELISA étaient de 60 mg/kg dans les trois échantillons.

RESULTATS

Les concentrations de la MT dans les échantillons d'eau étaient nulles, les valeurs étaient au-dessous du seuil de détection du test ELISA ($< 0,16 \mu\text{g/kg}$).

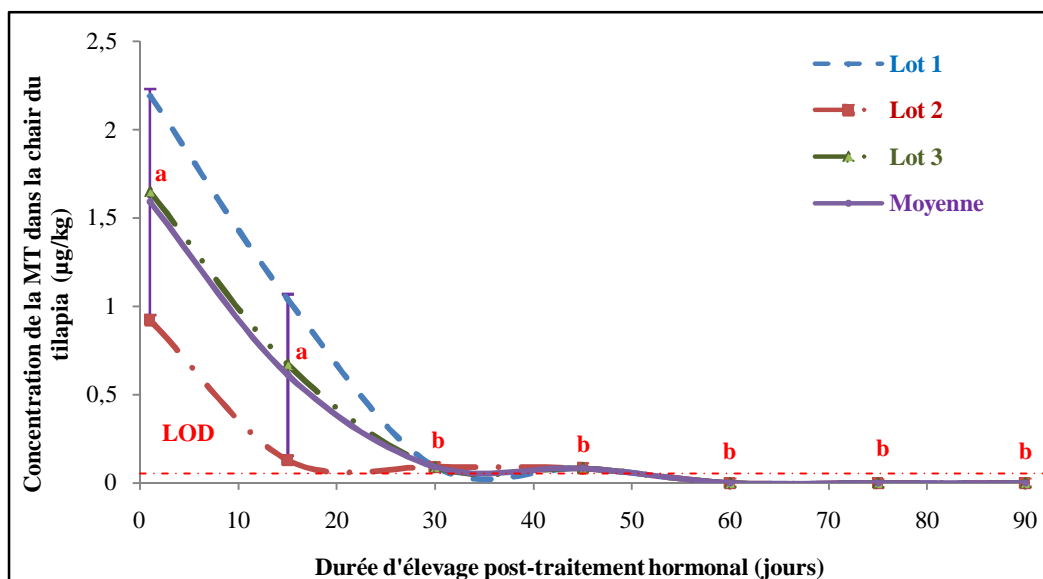


Figure 33 : Concentration résiduelle post-traitement de la 17α-méthyle testostérone ($\mu\text{g/kg}$) dans la chair du tilapia du Nil (*O. niloticus*).

L'expérience a été répétée 3 fois (3 différents aquarium), moyenne \pm Ecart-type. Les valeurs marquées de lettres similaires ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$).

3. Qualité microbiologique et physicochimique de l'eau et de l'aliment d'élevage :

Les résultats de la qualité microbiologique des échantillons d'eaux (bactéries indicatrices) à partir de la ferme aquacole algérienne "Fat-Steppes" sont repris dans le tableau XVIII. Les résultats des bactéries pathogènes dénombrés à partir des mêmes échantillons sont repris dans le tableau XIX.

Tableau XVIII : Dénombrement des bactéries indicatrices à partir des échantillons d'eaux douces prélevées de la ferme aquacole "Fat-Steppes".

Groupe des bactéries indicatrices	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Méthode normalisée
Germes aérobies à 37°C (UFC/ml)	$2,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^9$	ISO 6222
Coliformes totaux (UFC/ml)	$1,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	ISO 9308-2
Coliformes fécaux (UFC/ml)	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	ISO 9308-2
Streptocoques fécaux (UFC/ml)	$3,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	ISO 7899-1
Anaérobies sulfito-réducteurs (UFC/ml)	$1,5 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4$	ISO 6461-2

Les résultats obtenus démontrent que l'eau utilisée dans les étangs d'élevage dans la ferme "Fat-Steppes" de tilapiculture est de mauvaise qualité microbiologique. Le nombre des germes totaux dépasse 10^6 UFC/ml dans les trois échantillons prélevés. Cette charge bactérienne continue d'augmenter au fil du temps pour atteindre $4,6 \times 10^9$ UFC/ml dans le troisième

RESULTATS

échantillon (prélèvement réalisé 4 mois après le premier). La charge des coliformes totaux dépasse les 10^5 UFC/ml dans les échantillons prélevés. Nous constatons que les coliformes fécaux (thermotolérants) prédominent la charge des coliformes totaux avec une valeur minimale supérieure à 10^4 UFC/ml. Idem pour les streptocoques et les anaérobies sulfito-réducteurs, leurs charges respectives dépassent les 10^4 UFC/ml et 10^3 UFC/ml.

Tableau XIX : Numération des bactéries pathogènes à partir des échantillons d'eaux douce prélevées de la ferme aquacole "Fat-Steppes".

Bactéries	Echantillon	Description des colonies	Diamètre	Nombre
Staphylocoques	1	* colonies de couleur saumon: bombées à contours réguliers, brillantes	1-8 mm	+
		* colonies blanches légèrement surélevées et à contours légèrement irréguliers	< 1-3 mm	+
		* petite colonies de couleur jaune, à contours réguliers, bombées et brillantes	< 1-1 mm	+
		* colonies de couleur rosâtre, plate, brillantes et de contours réguliers	< 1-2 mm	++
	2	* colonies de couleur jaune, de contours réguliers, bombées et brillantes	1 mm	+
		* colonies de couleur légèrement rosâtre, centre surélevé, brillantes, rondes * colonies de couleur orangée, brillantes, à contours irréguliers, à centre foncé	< 1-6 mm < 1-6 mm	++ +
3	* colonies jaunes bambées, à contours irréguliers et brillantes * colonies de couleur blanchâtre à contours réguliers, plates, aspect crémeux	1-3 mm 1-4 mm	++ ++	
<i>Pseudomonas Spp</i>	1	King A : * colonies beiges, plates rondes		+++
		King B : * petites colonies jaune, rondes, bombées et brillantes	1 mm	+
		* colonie orange, transparente, bombée	2 mm	+
		* colonies blanches, de contours légèrement irréguliers, plates, non brillantes	2 mm	++
		* colonies beiges, de contours irréguliers, légèrement surélevées brillantes	2-3 mm	++
	2	King B : * colonies beiges légèrement transparentes * colonie orange, ronde, brillante, plate	5 mm	+++ +
		King A : * colonies jaunes de contours irréguliers plates, ternes * colonies beiges, transparentes, brillantes	2 mm	+++ +
	3	King B : * colonies blanches, à contours légèrement irréguliers, bombées crémeuses	2-3 mm	+++
		King A : * colonies blanchâtres à beiges plus ou moins transparentes à contours légèrement irréguliers, plates, peu brillantes	< 1-2 mm	+++
Salmonelle & Shigelles	1	* colonies saumon à rouge brique	1-2 mm	++
		* colonies grises de petit diamètre	1-2 mm	+
	2	* colonies roses de diamètre croissant	1-4 mm	++
		* colonies saumon à centre gris à noire	< 1-2 mm	++
	3	* colonies saumon petites	< 1-2 mm	++
		*colonies grises à bleuâtres	2-3 mm	+
<i>E. coli</i>	1	*colonies beige	1 mm	++
		*colonies grise	1-2 mm	++
	2	*colonies roses	1-3 mm	++
		*colonies noire	2 mm	++
	3	*colonies blanches	< 1-2 mm	++
		*colonies grises	2-3 mm	++

Nombre de colonies : + : entre 1 et 19, ++ : entre 20 et 300, +++ : > 300

RESULTATS

Il ressort de ces résultats que des bactéries pathogènes sont présentes dans les échantillons d'eau douce prélevés à Fat-Steppes. Des streptocoques spp., des *pseudomonas* spp., *E. coli* et une panoplie d'entérobactéries pathogènes en particulier des Salmonelles et des Shigelles. En fonction des descriptions des colonies recensées, des bactéries du genre : *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus vulgaris* et *mirabilis*, *Shigella*, *Serratia*, *E. Hafniae*, *Alkalescens*, *Proteus morgani*, *Proteus rettgeri*, *Providencia*, *Citrobacter freundii* et *Arizona* ont été aussi énumérées.

- Les résultats de la qualité microbiologique des aliments fournis par la ferme aquacole "Fat-Steppes" et par le laboratoire *AQUABIOR* sont repris dans le Tableau XX.

Tableau XX : Résultats de l'analyse microbiologique des aliments d'élevage (utilisés à Fat-Steppes et au laboratoire *AQUABIOR*) selon la norme algérienne NA 6115.

Détermination	Aliment Fat-Steppes (UFC)	Aliment <i>AQUABIOR</i> (UFC)	Méthode normalisée	Critères (NA 6115)
Germes aérobies à 30°C/g	5,4 x 10 ⁵	3,8 x 10 ²	ISO 4833-2	< 3 x 10 ⁶ ufc/g
<i>E. coli</i> / g	Abs	Abs	ISO 9308-2	< 10 ² ufc/g
Clostridium Sulfito-Réducteurs à 46°C/g	180	70	ISO 7937	10 ² ufc/g
Salmonella / 25g	Abs	Abs	ISO 6579	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i> /g	2,3	Abs	ISO 6888-1	10 ³ ufc/g
Moisissures /g	7,3 x 10 ²	50	ISO 21527-1	10 ³ ufc/g

Moyenne ± SD (n = 3).

Le tableau XX révèle que la qualité microbiologique d'aliment fabriqué à Fat-Steppes est inférieure à celui formulé à *AQUABIOR*. Le taux des anaérobies sulfite-réducteur excède le seuil toléré par la norme algérienne NA 6115. Le taux des moisissures bien qu'inférieur à la norme algérienne, il est conséquent. Les deux aliments sont exempts de bactéries pathogènes.

- Les résultats de la qualité physicochimique de l'eau prélevée à partir de la ferme aquacole "Fat-Steppes" ainsi qu'à partir de l'expérience d'inversion sexuelle à la 17 α -méthyle testostérone au CEFRA et l'expérience de contamination avec l'acide oxolinique, qui a été réalisée à *AQUABIOR*, sont repris dans le tableau XXI.

RESULTATS

Tableau XXI : Analyse physicochimique de l'eau douce de tilapiculture.

Paramètres	Eau prélevée Au Fat-Step	Eau prélevée à AQUABIOR	Eau prélevée Au CEFRA	Critères FAO (1989)
Température (C°)	26,0 – 33,2	26,8 – 27,3	26,2 – 28,4	21 - 30
pH	7,6 – 8,9	7,2 – 7,84	6,8 – 7,92	7 - 8
Oxygène dissous (mg/l)	0,8 – 3,7	4,2 – 6,1	4,6 – 8,1	2 - 4
Nitrites (mg/l)	0,87 – 4,92	0,1 – 0,92	0,03 – 0,86	< 2,1
Nitrates (mg/l)	15,35 – 47,70	5,35 – 21,70	/	0 – 30
Ammoniaque (mg/l)	2,33 – 11,01	0,33 – 4,01	0,05 – 1,09	< 2,3

Il ressort de ce tableau que la qualité physicochimique des eaux contrôlées varie en fonction de leurs origines. Les eaux prélevées à AQUABIOR et au CEFRA présentent des valeurs relativement correctes selon les normes établies par la FAO (1989). Par contre, les valeurs enregistrées à partir de l'eau prélevée de la ferme aquacole "Fat-Step" dépassent les normes de la FAO en vigueur. Le taux d'oxygène dissous est trop faible et inférieur à 3,7 mg/l. Le taux des nitrites est pratiquement le double du seuil limite de 2,1 mg/l pour l'élevage des alevins de tilapia (*O. niloticus*). Le taux des nitrates dépasse le seuil accepté de 30 mg/l. La valeur minimale enregistrée pour le taux d'ammoniaque équivaut la limite tolérée (2,3 mg/l). La concentration en ammoniaque est trop élevée.

III. SURVEILLANCE DES DANGERS PENDANT LA PHASE *POST MORTEM*

1. Evolution temporelle de la qualité post mortem du tilapia (*O. niloticus*) :

1.1. Qualité sensorielle :

La Figure 34 illustre, sous forme de courbe, les résultats de l'analyse sensorielle du tilapia conservé à 4°C et à température ambiante (30°C). La qualité organoleptique du tilapia décline significativement ($p < 0,05$) en fonction du temps de conservation. Un plateau se dessine après 12 h de stockage à température ambiante (30°C). Au cours de la conservation à 4°C, deux plateaux apparaissent entre les 6h et 24h de conservation et entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour. Le premier à un score de 8 (correspondant à une qualité excellente) et le second à un score de 16 (correspondant à une qualité acceptable). Par la suite, la qualité des poissons commence à diminuer en raison de la formation de mucus gris jaunâtre sur le corps et d'un mucus laiteux jaunâtre sur les branchies, perte de pigmentation, d'un dégagement d'odeurs désagréables (putride), et la chair devient molle. Les poissons ne sont plus acceptables et sont marqués comme non comestibles (score = 24) après 5 jours à 4°C et seulement à 12 h à 30°C.

RESULTATS

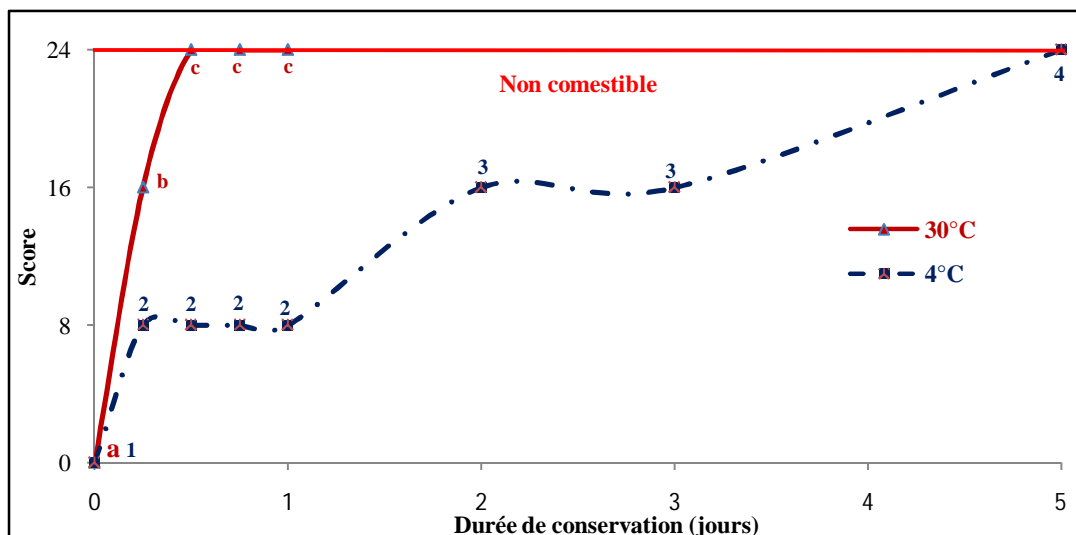


Figure 34 : Evolution temporelle de la qualité sensorielle du tilapia (*O. niloticus*) conservé à 30°C et à 4°C.

Moyenne \pm SD (n = 3). Les valeurs désignées par des lettres / chiffres similaires sur la même courbe ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$). La ligne discontinue représente le rejet sensoriel.


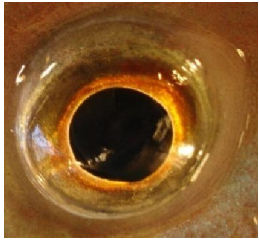
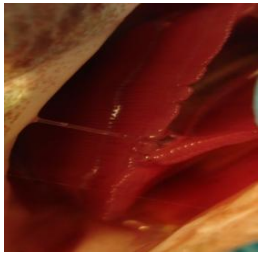

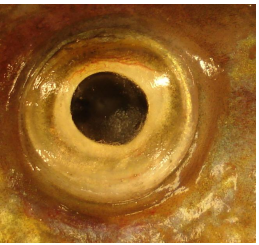
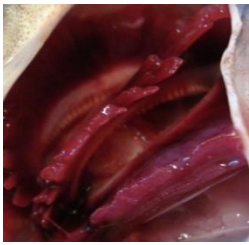

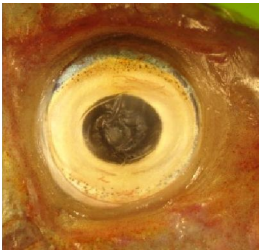
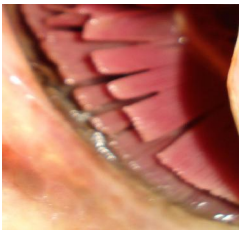
La planche 1 illustre les différents stades de l'évolution de la qualité organoleptique du tilapia conservé à 30°C et à 4°C en fonction du temps. Les résultats démontrent la dégradation temporelle progressive de l'aspect général du poisson, de la forme des yeux et de l'aspect et l'odeur au niveau des branchies. A 0 heure le poisson a un aspect luisant, la chair ferme et rigide, les yeux sont transparents et convexes, les branchies sont de couleur rouge vif et sans odeur.

A 6 heures d'entreposage à 30°C et jusqu'au 3^{ème} jour de conservation à 4°C, la pigmentation du tilapia est en voie de décoloration, la chair devient un peu molle, les yeux sont plats et la cornée est opalescente, les branchies deviennent brunes revêtues d'un mucus opaque et épais et l'odeur est grasse.

Enfin à 12 heures d'entreposage à 30°C et au 5^{ème} jour de conservation à 4°C, le poisson devient flasque et la pigmentation ternie, les yeux sont concaves au centre, la pupille est grise et la cornée est laiteuse, les branchies sont jaunâtres recouvertes d'un mucus laiteux et l'odeur est aigre.

RESULTATS

*Planche 1 : Analyse organoleptique du tilapia (*O. niloticus*) conservé à 30°C et 40°C.*

Score	Aspect général	Œil	Branchies
<p>Tilapia ultra frais (0 heure) (score = 0)</p>			
<p>Tilapia acceptable 6 heures à 30°C & 3 jours à 4°C (score = 16)</p>			
<p>Tilapia altéré 12 heures à 30°C & 5 jours à 4°C (score = 24)</p>			

Le score attribué (0, 16, 24) correspond à l'état de fraîcheur du tilapia jugé sur l'ensemble des caractéristiques organoleptiques (aspect général, forme de l'œil et couleur et odeur des branchies) qui sont détaillées dans le tableau IX de la page 82.

1.2. Qualité microbiologique :

Les cinétiques de l'évolution temporelle de la charge bactérienne, représentée par la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et les entérobactéries (ENT), du tilapia conservé à 4°C et à 30°C sont reprises dans la Figure 35 A et Figure 35 B respectivement.

RESULTATS

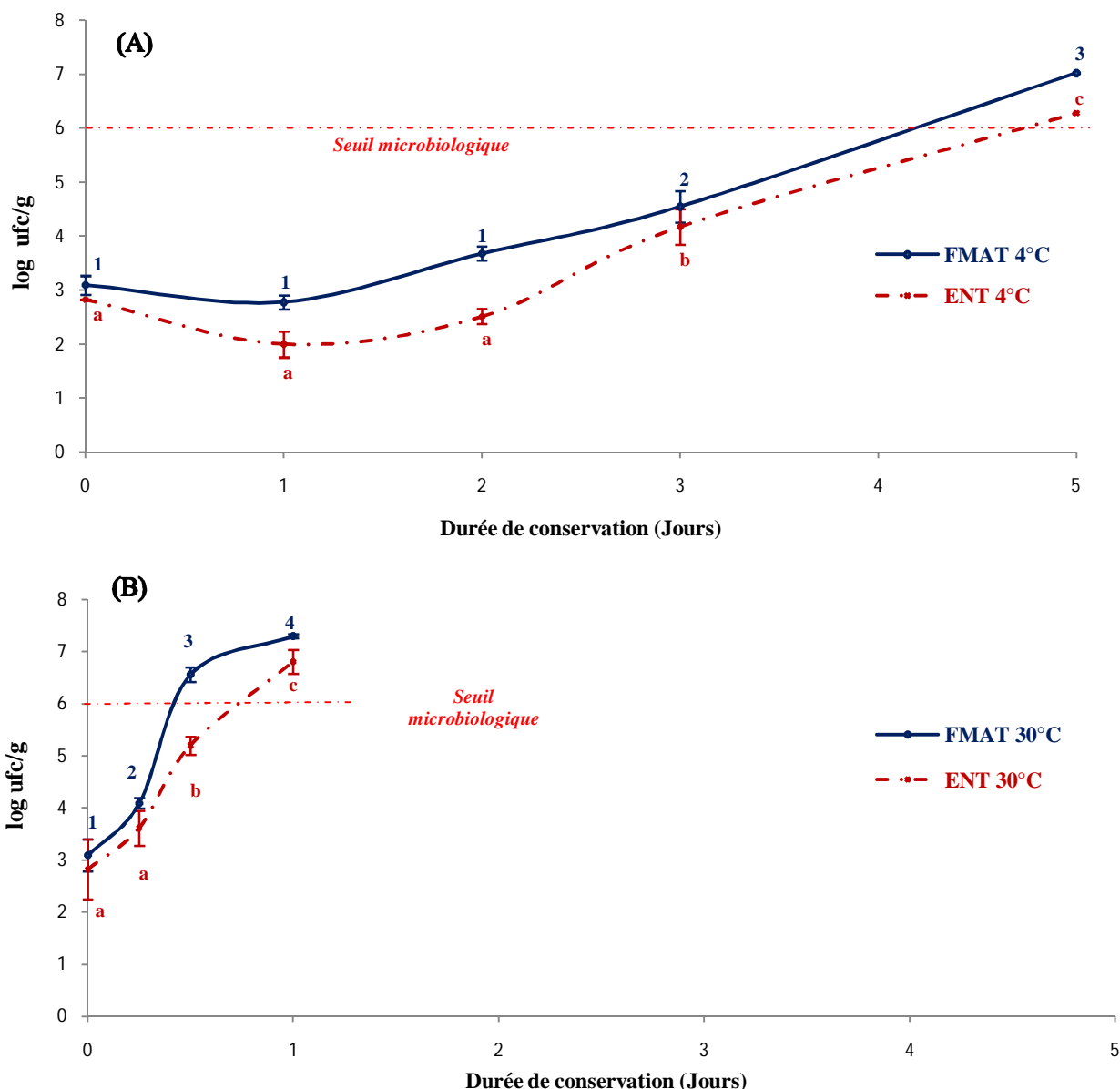


Figure 35 : Evolution temporelle de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et des Entérobactéries (ENT) du tilapia (*O. niloticus*) conservé à 4°C (A) et 30°C (B).

Moyenne \pm SD (n = 3). Les valeurs désignées par des lettres / numéros similaires sur la même courbe ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$). La ligne discontinue représente le seuil microbiologique fixé par l'ICMSF (1986).

La charge bactérienne initiale dans le premier prélèvement est de l'ordre de 3,1 log cfu g⁻¹ de FMAT et 2,83 log cfu g⁻¹ d'ENT. Cette charge bactérienne à 30°C évolue significativement ($p < 0,05$) et rapidement à partir de la 6^{ème} heure pour atteindre 7,3 log cfu g⁻¹ pour les FMAT et 6,8 log cfu g⁻¹ pour les entérobactéries au bout de 24 heures d'entreposage. Quant à la conservation à 4°C, la charge bactérienne, en terme de valeurs absolues, diminue légèrement le premier jour jusqu'à 2,78 log cfu g⁻¹ pour les FMAT et à 2,0 log cfu g⁻¹ pour les ENT. Ces valeurs restent statistiquement stables jusqu'au deuxième jour avant d'augmenter significativement ($p < 0,05$) et dépasser les 4 log cfu g⁻¹ pour les deux paramètres

RESULTATS

microbiologiques étudiés. Par la suite, la charge microbienne subie un bloom et dépasse significativement ($p < 0,05$) le seuil de $7,0 \log \text{cfu g}^{-1}$ pour les FMAT et celui de $6,0 \log \text{cfu g}^{-1}$ pour les ENT.

1.3. Evolution de la qualité biochimique de la chair de tilapia au cours de sa conservation

1.3.1. pH

En terme de valeurs absolues, le pH initial de $6,66 \pm 0,11$ (Figure 36) diminue légèrement jusqu'à la valeur de $6,54 \pm 0,13$ dans les première 6 heures dans les deux modes de conservation (4°C et 30°C). Par la suite, cette valeur diminue significativement ($p < 0,05$) jusqu'à $6,11 \pm 0,07$ et à $6,42 \pm 0,05$ au bout de 12 heures de conservation à 30°C et 4°C respectivement. Ces valeurs restent statistiquement inchangées tout au long des périodes de conservations étudiées. En terme de valeurs absolues, le pH augmente légèrement jusqu'à $6,24 \pm 0,01$ à température ambiante.

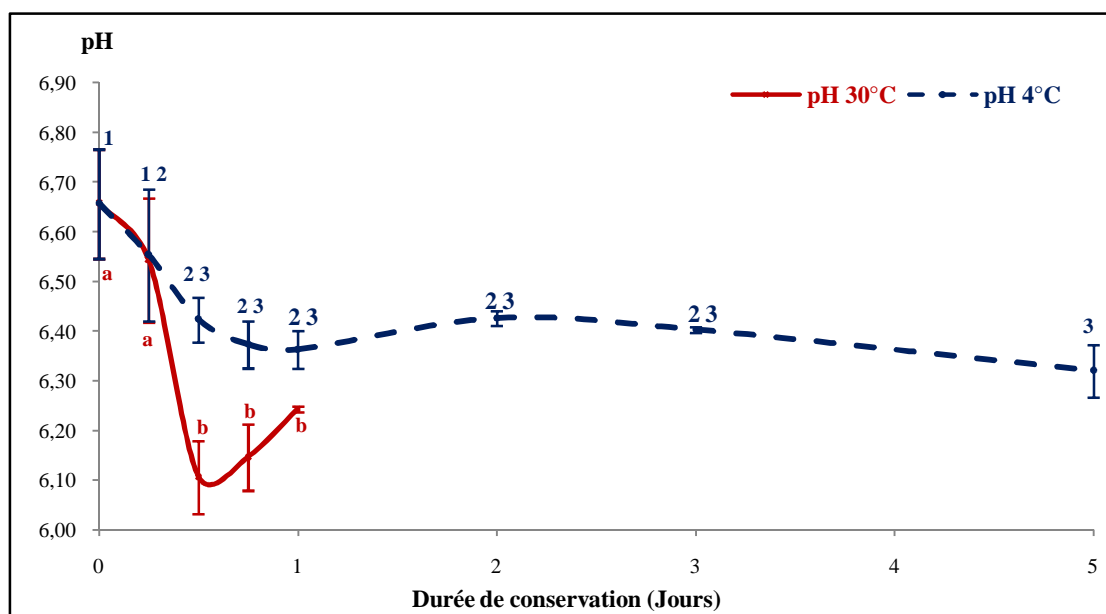


Figure 36 : Evolution temporelle du pH Post mortem du tilapia (*O. niloticus*) conservé à 4°C et à 30°C .

Moyenne \pm SD ($n = 3$). Les valeurs désignées par des lettres / numéros similaires sur la même courbe ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$).

RESULTATS

1.3.2. Oxydation des lipides

a. Diènes conjugués :

L'évolution des diènes conjugués (produits primaires de l'oxydation lipidique) du lot conservé à 30°C et du lot conservé à 4°C du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) est représentée par la Figure 37.

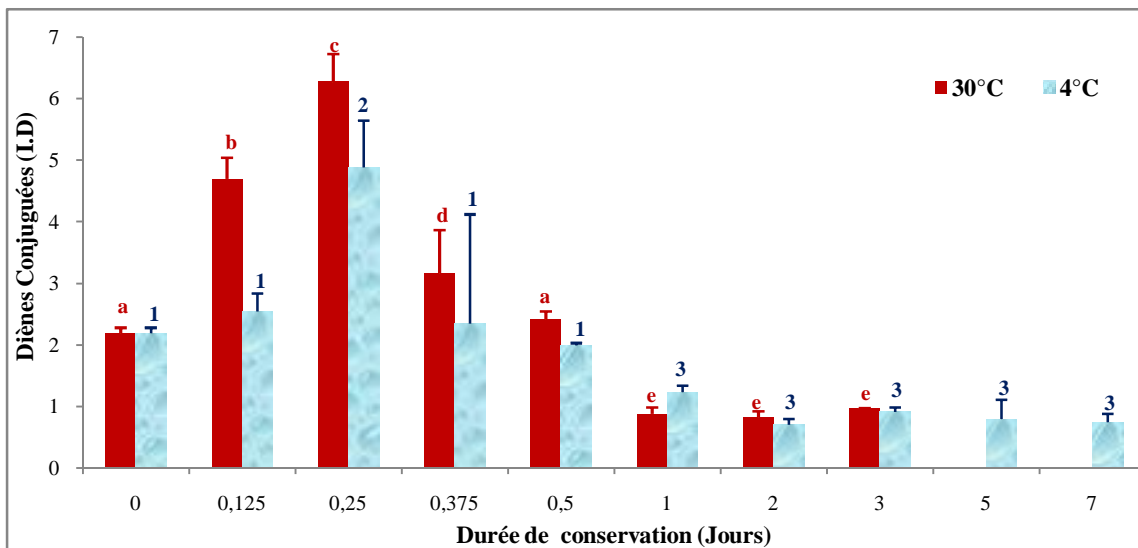


Figure 37 : Evolution temporelle des diènes conjugués (Indice Diène) chez le tilapia du Nil (*O.niloticus*) conservé à 4°C et 30°C.

Moyenne \pm écart type (n = 5). Les valeurs désignées par des lettres / numéros similaires sur les piliers de même couleur ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$).

La valeur initiale en indice diènes chez le tilapia fraîchement pêché est estimée à 2,19. Cette valeur évolue significativement ($p < 0,05$) pendant les 6 premières heures de conservation pour atteindre après 6 heures de conservation, un pic en indice diènes de 4,9 à 4°C et 6,3 à 30°C. Par la suite, ces valeurs rechutent significativement ($p < 0,05$) au niveau des valeurs initiales en indice diènes avant de se stabiliser en dessous de la valeur de 1 à partir du premier jour *post mortem* dans les deux modes de conservation (à 30°C et à 4°C).

b. Hydroperoxydes & TBARS :

Les cinétiques comparatives de l'évolution temporelle des hydroperoxydes (produits primaires de l'oxydation lipidique) et des TBARS (produits secondaires de l'oxydation) du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) conservé à 4°C et à 30°C sont illustrées dans la Figure 38A et la Figure 38B respectivement. Les hydroperoxydes et les TBARS chez le tilapia évoluent de la même manière pour les deux modes de conservation étudiés (4°C et 30°C). La valeur initiale de $2,46 \pm 0,16$ mmoles Eq CuOOH kg^{-1} de la chair de tilapia fraîche augmente significativement ($p < 0,05$) au bout d'1 jour à maximum de $5,12 \pm 0,17$ mmoles Eq CuOOH kg^{-1} de chair à 4°C

RESULTATS

(Figure 38A) et un maximum de $7,22 \pm 0,35$ mmoles Eq CuOOH kg^{-1} de chair à 30°C (Figure 38B). Ensuite, ces concentrations déclinent rapidement et significativement ($p < 0,05$) jusqu'à atteindre $0,30 \pm 0,05$ mmoles Eq CuOOH kg^{-1} de chair à 4°C et $1,02 \pm 0,19$ mmoles Eq CuOOH kg^{-1} de chair à 30°C.

La cinétique des TBARS est inversement proportionnelle à la cinétique des hydroperoxydes. Les concentrations des TBARS restent faibles (en-dessous de 0,5 mg MDA kg^{-1}) et statistiquement stables pendant les neuf premières heures de conservation. Ensuite, ces concentrations croissent significativement ($p < 0,05$) à partir de la 12^{ème} heures avant de se stabiliser statistiquement ($p < 0,05$) à nouveau au bout de 2 jours à 30°C et de 3 jours à 4°C.

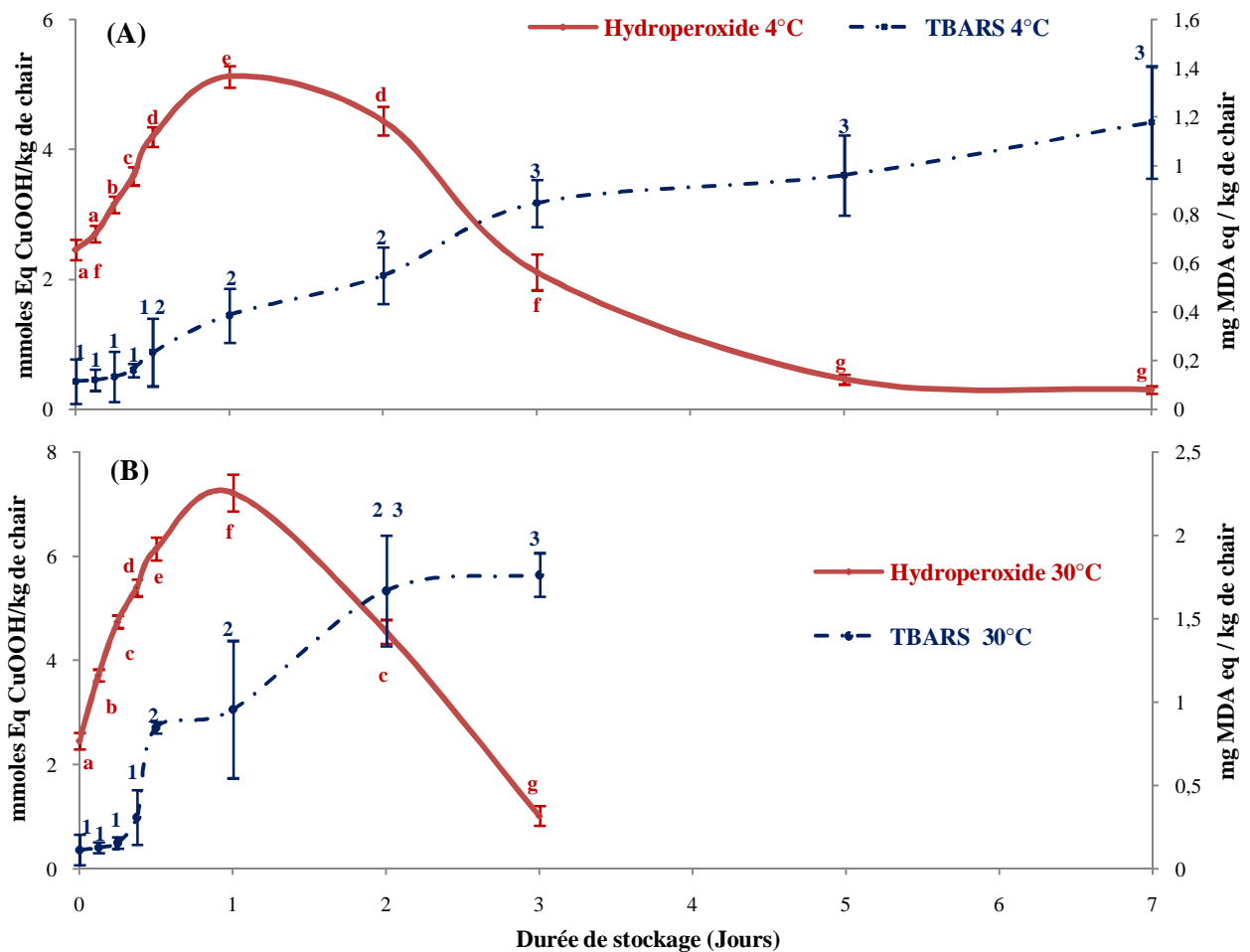


Figure 38 : Changement temporel des concentrations des hydroperoxydes (exprimés en équivalents d'hydroperoxydes de cumène) et des TBARS (exprimés en mg équivalent malonaldéhyde par kg de poids humide) des échantillons de tilapia (*O. niloticus*) conservés à 4°C (A) et 30°C (B).

Moyenne \pm SD (n = 5). Les valeurs désignées par des lettres / numéros similaires sur la même courbe ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$).

RESULTATS

1.3.3. Protéolyse bactérienne et enzymatique

a. ABVT & TMA-N :

Les concentrations d'ABVT et de TMA-N du tilapia conservé à 4°C et à 30°C sont illustrées dans la Figure 39A et la Figure 39B respectivement. Les résultats démontrent que l'évolution des concentrations d'ABVT et du TMA-N est linéaire en fonction du temps indépendamment du mode de stockage. Au début de la conservation, la valeur d'ABVT est de $8,12 \pm 0,48$ mg 100 g⁻¹ de chair. Cette valeur augmente progressivement durant les premières heures de stockage. Ensuite, elle évolue rapidement et significativement ($p < 0,05$) pour atteindre $35,84 \pm 0,56$ mg ABVT 100 g⁻¹ de chair après 12 h à 30°C et $37,89 \pm 0,43$ mg ABVT100 g⁻¹ après 5 jours à 4°C (figure 39A).

Le tilapia fraîchement prélevé contient une faible concentration en TMA-N ($0,65 \pm 0,16$ TMA-N100 g⁻¹ de mg). Ensuite, cette concentration augmente significativement ($p < 0,05$) et atteint $8,49 \pm 0,43$ mg TMA-N 100 g⁻¹ après 12 h à 30°C et $15,96 \pm 0,28$ mg TMA-N 100 g⁻¹ après 5 jours à 4°C (figure 39B).

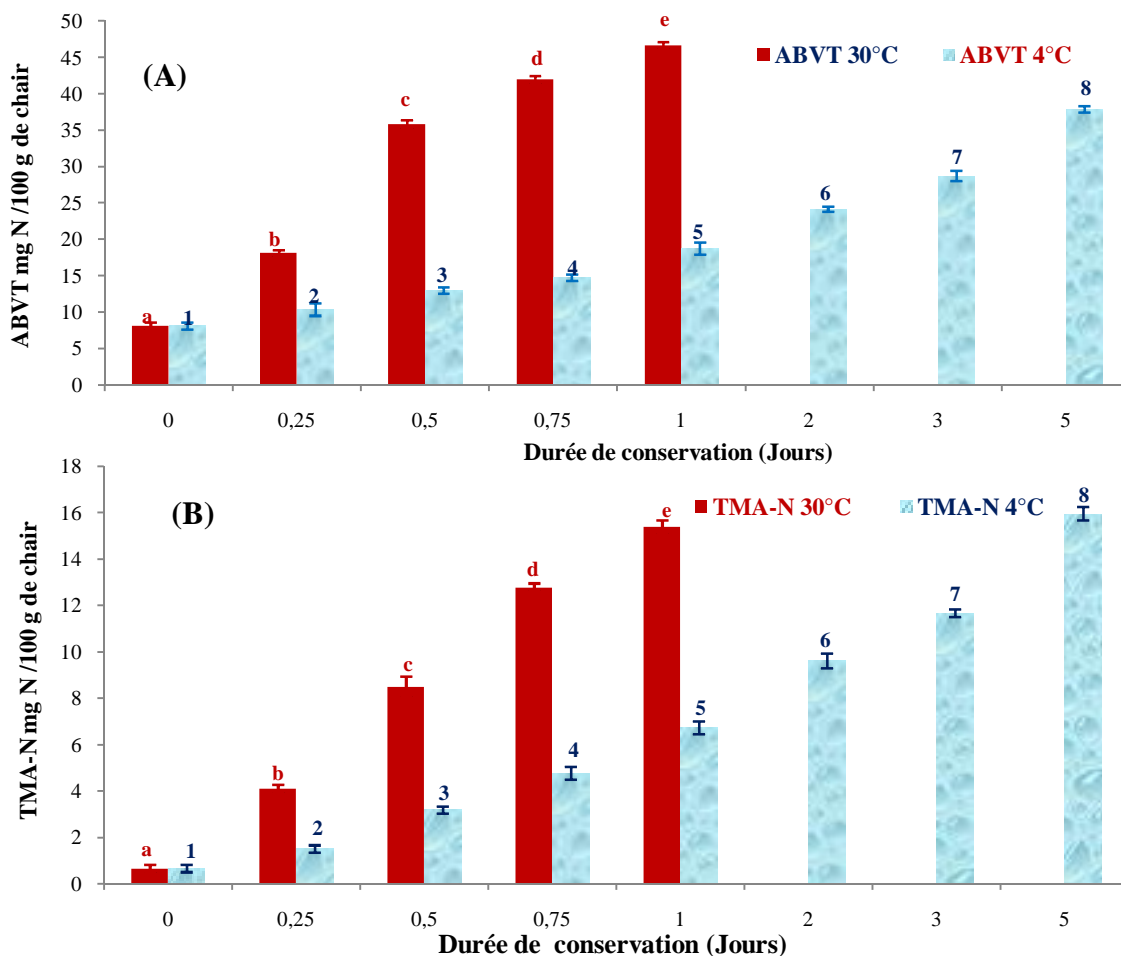


Figure 39 : Changement temporel de l'ABVT (A) et du TMA-N (B) des échantillons de tilapia entier (*O. niloticus*) conservés à 4°C et 30°C.

Moyenne \pm SD (n = 3). Les valeurs désignées par des lettres / numéros similaires sur la même courbe ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$).

RESULTATS

b. Amines biogènes :

1) *Paramètres de performance de la méthode*

Les résultats obtenus montrent que les amines biogènes dansylées migrent sur la plaque HPTLC (Silica gel G60) en fonction de leurs poids moléculaires, en utilisant la phase mobile constituée de chloroforme/ triéthylamine / diéthyle éther (4 :1 :1) (v/v/v), dans l'ordre ascendant suivant : ammoniac, putrescine, cadavérine, spermidine, histamine, spermine et tyramine. Leurs rapports frontaux (Rf) sont de l'ordre de : 0,26, 0,34, 0,45, 0,57, 0,60, 0,66, 0,86 respectivement (Figure 40).

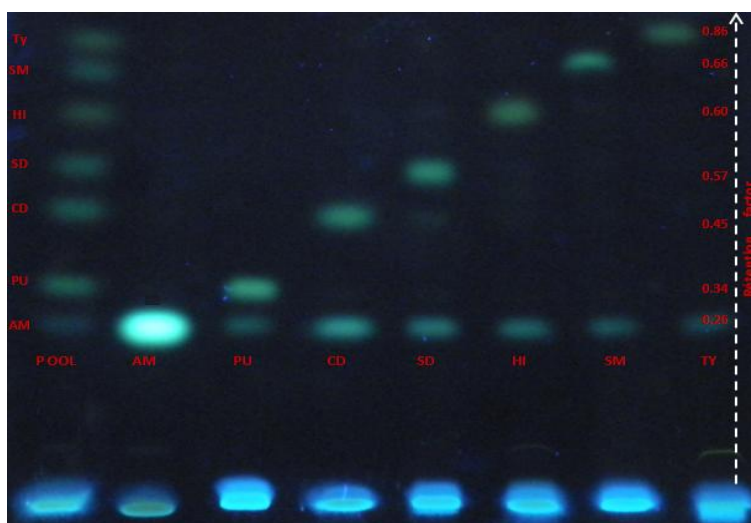


Figure 40 : Séparation et migration des amines biogènes dansylées sur plaque HPTLC – Silica gel G60 en utilisant la phase mobile (chloroforme- diéthyle éther- triéthylamine (4:1:1)).

Ammoniac (AM), putrescine (PU), cadavérine (CD), spermidine (SD), histamine (HI), spermine (SM) et tyramine (TY).

L'application de différentes concentrations de pools des six amines biogènes avec la nouvelle méthode HPTLC développée révèle que la limite de détection est de 5 µg/g (Figure 41).

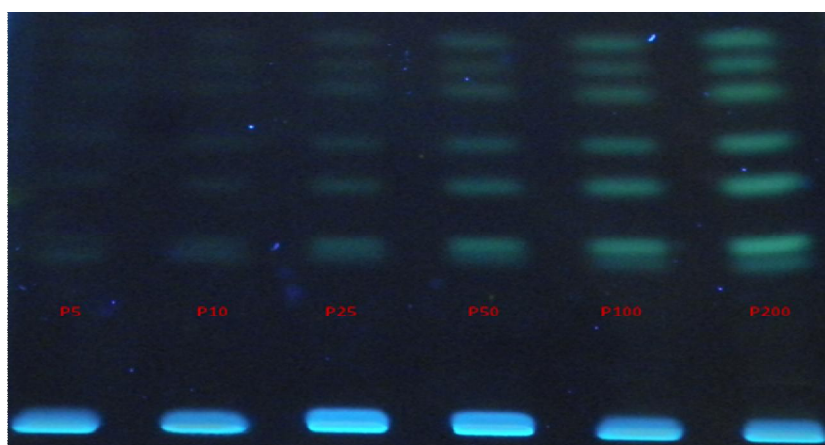


Figure 41 : Limite de détection de la méthode HPTLC réalisées à partir de concentrations croissantes en pool de standards des six amines biogène. Pool 5 µg/g (P5), Pool 10 µg/g (P10), Pool 25 µg/g (P25), Pool 50 µg/g (P50), Pool 100 µg/g (P100) et Pool 200 µg/g (P200).

RESULTATS

- La linéarité de la méthode HPTLC est bonne pour les six amines biogènes étudiées (Figure 42). Le facteur de corrélation R^2 de la méthode est d'un minimum de 0,984 pour la spermidine et d'un maximum de 0,997 pour la cadavérine.

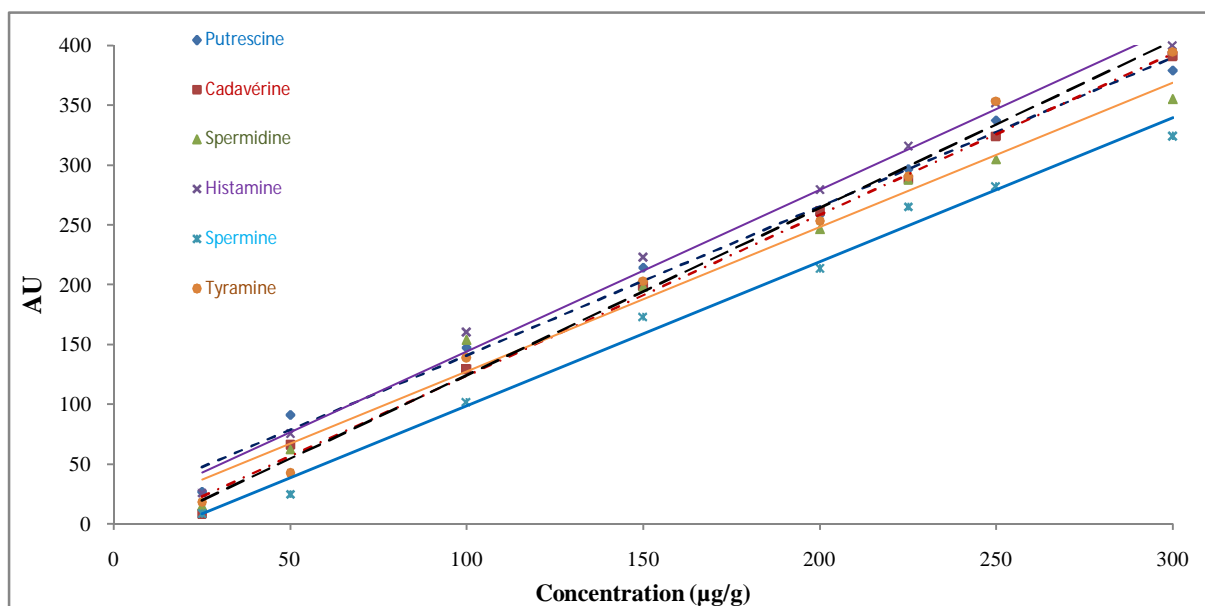


Figure 42 : courbes de calibration des six amines biogènes réalisées en standards de putrescine (PU), cadavérine (CD), spermidine (SD), histamine (HI), spermine (SM) et tyramine (TY).

Les six équations des courbes de calibration des amines biogènes et leurs coefficients de corrélation sont repris dans le Tableau XXII :

Tableau XXII : Les équations des courbes étalons et leurs coefficients de corrélation correspondants des six amines biogènes.

Amine biogène	Equations des courbes étalons	R^2
putrescine (PU)	$y_{\text{put}} = 1,244x + 16,76$	0,990
cadavérine (CD)	$y_{\text{cad}} = 1,345x - 10,36$	0,996
spermidine (SD)	$y_{\text{spd}} = 1,207x + 6,744$	0,984
histamine (HI)	$y_{\text{his}} = 1,349x + 9,420$	0,992
spermine (SM)	$y_{\text{spm}} = 1,204x - 21,69$	0,990
tyramine (TY)	$y_{\text{tyr}} = 1,396x - 15,11$	0,991

RESULTATS

- Les résultats obtenus pour la fidélité (répétabilité et reproductibilité) et de la justesse de la méthode sont repris dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIII : Justesse et fidélité de la méthode HPTLC développée selon la décision 2002/657/CE.

Amine biogène	Concentrations testées (µg/g)	Répétabilité de la méthode (Intra-day)			Reproductibilité de la méthode (Inter-day)		
		Concentrations moyennes (µg/g)	R.S.D (%) ≤ 16 %	Justesse (%) -20 % à +10 %	Concentrations moyennes (µg/g)	R.S.D (%) ≤ 16 %	Justesse (%) -20 % à +10 %
PUT	50	47,88	2,84	-4,25	41,78	13,43	-16,45
	100	81,98	5,34	-18,02	87,27	5,47	-12,73
	200	177,59	2,40	-11,21	187,37	4,70	-6,31
CAD	50	41,58	4,68	-16,83	43,41	6,80	-13,18
	100	89,46	2,57	-10,54	88,56	1,50	-11,44
	200	184,37	2,90	-7,81	186,64	2,50	-6,68
SPD	50	40,86	5,07	-18,29	43,51	9,05	-12,98
	100	90,17	6,48	-9,83	92,05	3,61	-7,95
	200	190,32	1,84	-4,84	189,99	1,88	-5,01
HIS	50	42,10	5,13	-15,81	44,80	8,04	-10,41
	100	89,52	3,94	-10,48	89,13	3,64	-10,87
	200	186,71	2,10	-6,65	186,53	1,25	-6,73
SPM	50	48,19	1,90	-3,62	46,58	4,87	-6,85
	100	83,41	4,72	-16,59	88,72	5,94	-11,28
	200	186,39	1,89	-6,81	189,67	1,78	-5,17
TYR	50	47,28	6,85	-5,45	46,99	2,20	-6,02
	100	91,51	3,81	-8,49	87,13	5,71	-12,87
	200	185,61	2,76	-7,20	187,22	1,65	-6,39

Il ressort de ce tableau que la fidélité et la justesse de la méthode HPTLC développée est bien conforme dans un intervalle de concentration entre 50 et 200 µg/g. Toutes les valeurs d'écart type relatif pour des analyses réalisées le même jour (répétabilité) ou à différents jours (répétabilité) sont inférieures au seuil de 16 % selon la décision 2002/657/CE. De même, tous les pourcentages de la justesse se retrouvent dans l'intervalle de -20 % à +10 % selon la décision 2002/657/CE.

RESULTATS

- Les résultats obtenus pour l'exactitude de la méthode sont repris dans le Tableau XXIV.

Tableau XXIV : Exactitude de la méthode HPTLC développéeselon la décision 2002/657/CE.

Amine biogène	Concentration théorique (µg/g)	Concentration mesurée (µg/g)	R.S.D (%) ≤ 16 %	Exactitude (%) -20 % à +10 %
PUT	25	22,69	5,50	-9,22
	50	44,34	3,81	-10,39
	100	96,10	1,00	-7,44
CAD	25	22,40	1,70	-15,39
	50	46,17	4,09	-2,28
	100	94,47	2,22	-15,78
SPM	25	23,14	1,36	-11,32
	50	45,12	3,99	-7,67
	100	96,23	1,59	-9,76
HIS	25	21,15	5,59	-14,67
	50	42,66	4,60	-12,41
	100	94,61	1,98	-12,63
SPD	25	24,43	5,49	-3,90
	50	43,80	8,00	-5,53
	100	95,62	1,71	-3,77
TYR	25	21,05	4,91	-5,39
	50	43,68	1,46	-4,38
	100	95,91	0,50	-4,09

Les résultats obtenus montrent que la nouvelle méthode HPTLC développée donne des résultats justes dans un intervalle de concentration entre 25 et 100 µg/g pour les six amines biogènes testées. Toutes les valeurs calculées se retrouvent dans l'intervalle de -20 % à +10 % établi dans la décision 2002/657/CE.

2) *Dosage*

2.1) Screening de six amines biogènes dans la chair de tilapia

Les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons du lot conservé à 30°C démontrent qu'au bout de 24 heures de conservation, les six amines biogènes sont présentes (Figure 43). La spermidine, la spermine et la tyramine sont constantes depuis le début jusqu'à la fin de la conservation. D'un point de vue qualitatif, les spots correspondant à la spermidine et la spermine présentent une intensité proche de celui du point de référence de 50 µg/g. Quant à la tyramine, sa concentration serait nettement plus faible. Par contre, la putrescine, la cadavérine et l'histamine sont absentes pendant les 12 premières heures et elles n'apparaissent qu'à partir de la 18^{ème} heure de conservation. Qualitativement, d'après l'intensité des spots, la concentration des deux premières dépasse le seuil des 100 µg/g et la concentration de l'histamine est inférieure à 50 µg/g.

RESULTATS

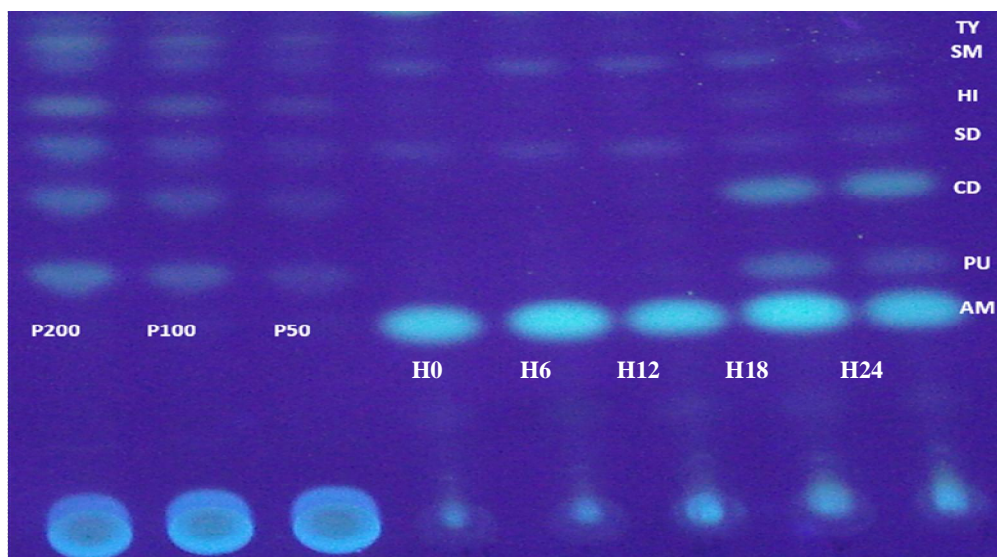


Figure 43: Résultats d'analyse des amines biogènes par HPTLC du lot de tilapia conservé à température ambiante (30°C) (0 heure – 24 heures).

P200 (pool 200 µg/g), P100 (pool 100 µg/g), P50 (pool 50 µg/g), AM (ammoniac), PU (putrescine), CD (cadavérine), SD (spermidine), HI (histamine), SM (spermine) et TY (tyramine).

Quant au lot conservé à 4°C (Figure 44), nous constatons la présence de seulement trois amines biogènes parmi les six amines étudiées. Les quantités de spermine, de spermidine et de tyramine semblent équivalentes. Le niveau en tyramine est faible (< 50 µg/g) et celui de la spermidine et de la spermine avoisine les 100 µg/g tout au long de la durée de conservation (en référence aux spots des 3 pools de standards). Les trois autres amines biogènes (putrescine, cadavérine et histamine) sont indécélabes.

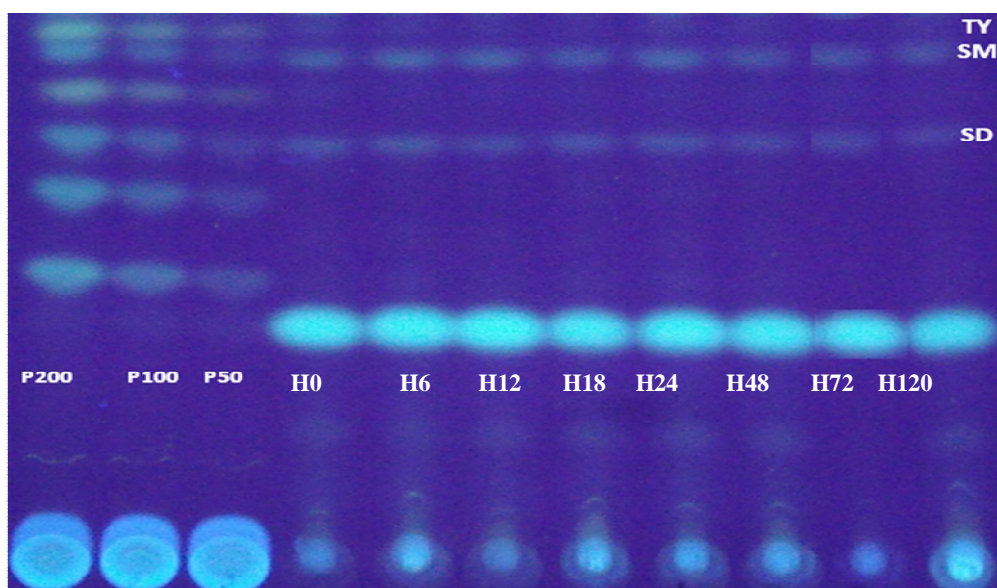


Figure 44 : Résultats d'analyse des amines biogènes par HPTLC du lot de tilapia conservé à 4°C (0 heure - J5).

P200 (pool 200 µg/g), P100 (pool 100 µg/g), P50 (pool 50 µg/g), SD (spermidine), SM (spermine) et TY (tyramine).

RESULTATS

2.2) Quantification

Les plaques HPTLC ont été scannées par densitomètre (CAMAG TLC Scanner 3). Les concentrations obtenues pour les échantillons du lot conservé à 30°C sont repris dans le Tableau XXV.

Tableau XXV : Résultats du dosage des amines biogènes par HPTLC dans la chair de tilapia conservé à température ambiante (30°C).

Temps de conservation (Heures)	Putrescine (µg/g)	Cadavérine (µg/g)	Spermidine (µg/g)	Histamine (µg/g)	Spermine (µg/g)	Tyramine (µg/g)
0	ND	ND	57,60 ± 3,60 a	ND	63,75 ± 5,08 a	24,36 ± 2,54 a
6	ND	ND	71,15 ± 12,79 a	ND	84,86 ± 8,69 b	24,49 ± 2,51 a
12	ND	ND	92,74 ± 3,90 b	ND	91,42 ± 4,60 b	23,97 ± 1,68 a
18	85,14 ± 17,88 a	114,86 ± 11,74 a	64,16 ± 4,53 a	33,40 ± 4,30 a	84,97 ± 2,37 b c	ND
24	134,54 ± 8,97 b	145,54 ± 1,28 b	39,17 ± 2,99 c	34,72 ± 3,90 a	82,52 ± 2,91 c	ND

n = 3, moyenne ± Ecart type, ND : non détecté. Les valeurs désignées par des lettres similaires dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, P < 0,05).

Les résultats obtenus sont bien corrélés avec ceux du screening ; la spermidine, la spermine et la tyramine apparaissent dès la première heure *Post mortem*. Les deux premières augmentent significativement (p < 0,05) et atteignent un pic à 92,74 ± 3,90 µg/g et à 91,42 ± 4,60 µg/g respectivement au bout de 12 heures. Ensuite, la concentration en spermidine diminue significativement (p < 0,05) après 18 h de conservation tandis que celle de la spermine est statistiquement plus faible mais reste stable entre 18 h et 24 h de conservation. Quant à la tyramine, sa concentration est faible (± 24 µg/g) et stable endéans les 12 premières heures de conservation, puis elle est indétectable pour la durée restante.

La putrescine, la cadavérine et l’histamine restent en dessous des limites de détection (5 µg/kg) de la méthode pendant les 12 premières heures. Par la suite, les deux premières augmentent significativement (p < 0,05) et dépassent le seuil des 100 µg/g dès la 18^{ème} heure de conservation. Par contre la concentration de l’histamine reste inférieure à 50 µg/g.

Les concentrations obtenues pour les échantillons du lot conservé à 4°C sont repris dans le Tableau XXVI.

Les résultats obtenus sont fortement corrélés avec ceux du screening ; uniquement trois amines biogènes (spermine, spermidine et tyramine) sont quantifiables. La spermidine augmente significativement (p < 0,05) et dépasse le seuil des 70 µg/g après 12 heures de conservation à 4°C. Elle atteint le pic de 87,13 ± 7,11 µg/g au bout de 18 heures de conservation. Au delà des 48 heures de stockage la spermidine rechute significativement (p < 0,05) et passe sous le seuil

RESULTATS

initial des 55 µg/g. La concentration initiale en spermine dans le tilapia fraîchement pêché est de l'ordre de 60 µg/g. Cette dernière régresse significativement ($p < 0,05$) après 12 heures de conservation puis évolue significativement ($p < 0,05$) à nouveau pour atteindre le pic de $124,47 \pm 0,81$ µg/g à la 18^{ème} heure d'entreposage à 4°C. Cette concentration décline significativement ($p < 0,05$) et reste statistiquement inchangée après 24 heures de conservation. La concentration initiale de la tyramine est très faible (± 25 µg/g) par rapport aux deux amines biogènes précédentes. Cette valeur augmente significativement ($p < 0,05$) pour atteindre le pic de $45,99 \pm 2,87$ µg/g avant de rechuter significativement ($p < 0,05$) à nouveau sous le seuil des 30 µg/g et rester statistiquement inchangée pour la durée restante de conservation à 4°C.

Tableau XXVI : Résultats du dosage des amines biogènes par HPTLC dans la chair de tilapia conservé à 4°C.

Temps de conservation (Heures)	Putrescine (µg/g)	Cadavérine (µg/g)	Spermidine (µg/g)	Histamine (µg/g)	Spermine (µg/g)	Tyramine (µg/g)
0	ND	ND	57,60± 3,61 a	ND	63,75± 5,08 a	24,36± 2,54 a
6	ND	ND	54,69± 7,33 a	ND	60,45± 6,51 a	29,88± 0,15 a
12	ND	ND	73,36± 2,98 b	ND	40,94± 1,51 b	45,99± 2,87 b
18	ND	ND	87,13± 7,11 c	ND	124,47± 0,81 c	28,80± 1,50 a
24	ND	ND	72,39± 2,00 b	ND	98,01± 2,26 d	28,28± 1,05 a
48	ND	ND	82,97± 0,49 c	ND	103,91± 1,31 d	25,77± 0,72 a
72	ND	ND	67,23± 4,08 b	ND	102,94± 4,82 d	27,30± 1,13 a
120	ND	ND	52,79± 3,83 a	ND	90,49± 4,42 d	21,64± 1,08 a

n = 3, moyenne ± Ecart type, ND : non détecté. Les valeurs désignées par des lettres similaires dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, $P < 0,05$).

RESULTATS

IV. ANALYSE & MAITRISE DES PCC (SYNTHESE)

1. Analyse des dangers et détermination des PCC de la production du tilapia à Fat-Steppes :

Les résultats de l'analyse des dangers et de la détermination des points de contrôle critiques (PCC) dans les étapes et à partir des intrants sont repris dans le Tableau XXVII.

Tableau XXVII : Analyse des dangers et détermination des PCCs de la production et de la commercialisation de tilapias (*O. niloticus*) produits à Fat-Steppes.

	Dangers potentiels	Causes (5M)	Mesure de maitrise	Evaluation du risque			Arbre de décision du Codex Alimentarius (1997)				PCC / BP
				Gravité	Fréquence	Risque	Q1	Q2	Q3	Q4	
ETAPES											
1. Reproduction & Ecllosion	B : Portage de pathogènes *	- Portage asymptomatique chez les reproducteurs (Matières premières). - Transmission verticale (Œufs) ou horizontale (Eau / Milieu).	Certification vétérinaire	Petit à modéré (en fonction du pathogène)	Modéré	Acceptable	O	N	O	O	BPV
2. Alevinage	B : Portage de pathogènes *	Transmission verticale ou horizontale (Eau / Milieu).	Certification vétérinaire	Petit à Modéré	Modéré	Acceptable	O	N	O	O	BPV
	C: Résidus de 17 α -méthyle testostérone (MT)	- Surdosage de la MT (>65mg par kg d'aliment / Méthode). - Traitement tardif (alevins âgés plus d'un mois post éclosion / Méthode). - Traitement prolongé (> 28 jours / Méthode).	- Formation du personnel - Respect des BPA et des BPV	Grand	Modéré	Majeur	O	N	O	N	PCC ₁ -C ₁
3. Grossissement	B : Portage de pathogènes*	- Transmission verticale (alevins) ou horizontale via l'eau (Milieu) ou via l'aliment (Matières premières). - Portage asymptomatique.	Suivi sanitaire vétérinaire des juvéniles et des adultes	Petit à Modéré	Modéré	Acceptable	O	N	O	O	BPV
	C: Résidus d'antibiotiques (Fluoroquinolones & Tétracyclines)	- Surdosage des antibiotiques (OXO > 12 mg par kg d'aliment / Méthode). - Contamination via l'eau (Milieu) et l'aliment (Matières premières) - Non respect des délais d'attente (< 8 jours) (Méthode)	- Formation du personnel (respect des BPA). - Respect des délais d'attente pour les antibiotiques.	Grand	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₂ -C ₂

RESULTATS

4. Pêche	B : Contamination bactérienne	Contamination croisée via le filet de pêche (Matériel) et les opérateurs (Main d'œuvre)	- Nettoyage et entretien des filets de pêche. - Port de tenue spéciale	Petit	petit	Mineur	/				BPH
5. Conditionnement & Transport	B : Prolifération bactérienne	Contamination croisée via les caisses (Matériel), via les opérateurs (Main d'œuvre), via la glace (Matériel) et via les moyens de transport (Matériel)	- Nettoyage des caisses, - Port de tenue spéciale pour les opérateurs, - Eau douce chlorée pour la fabrication de glace (BPH). - Respect de la chaîne du froid (< 5°C) - Mise à jeun des poissons (02 j avant l'écoulement) - Certification vétérinaire	Modéré	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₃ -B ₁
6. Commercialisation	B : Prolifération bactérienne	- Contamination croisée via le vendeur (Main d'œuvre), les caisses en bois (Matériel) et le sol (Milieu).	- Respect des BPH (caisses en plastiques, port de gants et nettoyage de l'environnement) - Conservation sous glace (0°) ou réfrigération (<5°C).	Modéré	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₄ -B ₂
	C : Oxydation lipidique (aldéhydes)			Modéré	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₅ -C ₃
	C : protéolyse bactérienne (ABVT & amines biogènes)	- Entreposage à température ambiante ou rupture de la chaîne du froid (Méthode).	Modéré	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₆ -C ₄	
	C : Migration à partir des emballages	- Emballage dans du papier de journal (Matériel)	- Emballage alimentaire	Petit	Petit	Mineur	/				BPH
INTRANTS											
Aliment	B : bactéries pathogènes (<i>E. coli</i> ^{1,2} , <i>S. aureus</i> ^{1,2} , <i>C. botulinum</i> type C ³ , <i>Salmonella</i> ^{4,5}) et moisissures ⁶ (<i>Aspergillus flavis</i> & <i>A. parasiticus</i>)	Aliment conservé dans un local humide (> 60 %) et à température ambiante (> 20°C)	- Fournisseurs agréés livrant des aliments conformes. - Inspection visuelle - Stockage > 20°C	Modéré	Modéré à Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₇ -B ₃
	C : résidus d'antibiotiques	- Surdosage des médicaments vétérinaires (antibiotiques ou MT) dans l'aliment (Méthode) - Traitement prolongé (Méthode)	- Formation du personnel (respect des BPA) - Identification et isolement de l'aliment – médicamenteux.	Modéré	Modéré	Majeur	O	N	O	N	PCC ₈ -C ₅
	C : résidus d'hormones						O	N	O	N	PCC ₉ -C ₆

RESULTATS

Eau	B : bactéries indicatrices et pathogènes (coliformes, salmonelles et clostridies)	Contamination fécale à partir des exploitations voisines (Milieu)	- Filtration et renouvellement régulier de l'eau (circuit fermé), - Choix du site (BPH)	Modéré	Modéré	Majeur	O	N	O	N	PCC ₁₀ -B ₄
	C : résidus d'antibiotiques	- Contamination environnementale (Milieu), - Contamination via l'aliment- médicamenteux perdus (Matière première)	Filtration régulière biologique et mécanique de l'eau (BPH) (circuit fermé)	Grand	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₁₁ -C ₇
	C : résidus d'hormones	- Contamination via les fèces et les excréments (branchiques et urinaires) du poisson (Milieu)		Grand	Grand	Majeur	O	N	O	N	PCC ₁₂ -C ₈

Q1 : Existe-il une ou plusieurs mesure (s) préventive (s) de maîtrise ?

Q2 : L'étape est-elle expressément conçue pour éliminer la probabilité d'apparition d'un danger ou de le ramener à un niveau acceptable ?

Q3 : Est-il possible qu'une contamination s'accompagnant de dangers identifiés survienne à un niveau dépassant les limites acceptables ou ces dangers risquent-ils d'atteindre des niveaux inacceptables ?

Q4 : Une étape subséquente permettra-t-elle d'éliminer le ou les dangers identifiés ou de ramener leur probabilité d'apparition à un niveau acceptable ?

PCC : point critique de contrôle ; BP: bonnes pratiques ; BPV : bonnes pratiques vétérinaires ; BPH : bonnes pratiques d'hygiène ; BPA : bonnes pratiques aquacoles ; B : biologique ; C : chimique ; Niveau de gravité : grand, modéré, petit ; niveau de probabilité (fréquence) : petit, modéré et grand ; niveau du risque : mineur, acceptable et majeur.

* : Pathogènes de tilapia Spp. responsables de zoonoses: *Mycobacterium marinum*. (Sonda-Santos & Lara-Flores, 2012 ; Lara-Flores *et al.*, 2014), *Vibrio vulnificus* (Mahmud *et al.*, 2010 ; Lo *et al.*, 2014), *Escherichia coli* (Rocha *et al.*, 2014), *Salmonella* Spp. (Nwiyi & Onyeabor, 2011 ; Wandili *et al.*, 2011 ; Makilla, 2014), *Vibrio parahaemolyticus* (Noorlis *et al.*, 2011), *Streptococcus iniae* (Baiano & Barnes, 2009 ; Al-Harbi, 2011 ; Wang *et al.*, 2011 ; Haenen *et al.*, 2013), *Streptococcus* Spp. (Ataguba *et al.*, 2014 ; Yilmaz & Ergun, 2014), *Streptococcus agalactiae* (Evans *et al.*, 2009), *Edwardsiella tarda* (Javier, 2012 ; Pridgeon *et al.*, 2014), *Aeromonas hydrophila* (Pridgeon *et al.*, 2014), *Staphylococcus aureus* (Gatti Junior *et al.*, 2014 ; Makilla, 2014), *Listeria* spp. (FAO, 1999b ; Hastein *et al.*, 2006 ; Edris *et al.*, 2014) , *Clostridium botulinum* (Huss *et al.*, 2000).

Pathogènes dans les aliments de poissons : *E. coli*^{1 2}, *Staphylococcus aureus*^{1 2} (Zmysłowska & Lewandowska, 2000 ; Nwabueze & Nwabueze, 2011), *Clostridium botulinum* C³ (Nol *et al.*, 2004), *Salmonella*^{4 5} (Lunestad *et al.*, 2007 ; Petreska *et al.*, 2013), *Aspergillus flavis* & *A. parasiticus*⁶ (Nyong & Olubunmi, 2014).

RESULTATS

Il ressort du Tableau XXVII qu'il existe **12** points critiques de contrôle (PCC) au sein de ce process de production (au niveau de Fat-Steppes) et de commercialisation du tilapia du Nil (*O. niloticus*). Dans la phase *anté mortem*, 02 PCCs biologique et 6 PCCs chimiques sont répertoriés. Les deux premiers sont en rapport avec la présence de bactéries pathogènes et de champignons dans l'eau et dans l'aliment d'élevage. Par contre les PCCS chimiques sont directement liés à l'utilisation de médicaments vétérinaires (hormones et antibiotiques).

Concernant la phase *Post mortem*, 4 autres PCCs sont répertoriés, les deux premiers sont de nature biologique et sont en rapport avec la contamination croisée lors du conditionnement ou du transport ou en rapport avec la prolifération bactérienne durant l'entreposage. Pour les deux autres PCCs de nature chimique, ils sont liés à l'altération biochimique (oxydation lipidique ou protéolyse chimique et microbienne) du poisson en fonction du mode et du temps d'entreposage chez le vendeur. D'autres dangers éventuels ont été également évoqués et considérés comme mineurs ou acceptables. Ces derniers représentent des défaillances dans le programme préalable de l'HACCP, c.à.d. les bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et aquacoles (BPA) ou ils seront maîtrisés ou atténués par des bonnes pratiques vétérinaires (BPA).

2. *Maitrise des PCC :*

Les résultats des étapes subséquentes (8 – 12) du système HACCP prévus pour la maîtrise des PCCs par la fixation de limites critiques, établissement de procédures de surveillance, des action correctives, action de vérification et tenue de documents sont repris dans le Tableau récapitulatif XXVIII. Uniquement les PCCs déterminés sont pris en considération. Les autres dangers mineurs et acceptables sont corrigés par l'application de bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et de bonnes pratiques vétérinaires (BPV).

Les méthodes analytiques de screening développées dans ce travail (test microbiologique des résidus d'antibiotiques, test ELISA, méthode HPTLC pour les amines biogènes avec dépôt manuel) et le contrôle de la température permettront de surveiller les différents PCCs déterminés dans ce process. Puisqu'il s'agit d'une bande unique de tilapias produite par an, idéalement, tout les PCCs de chaque lot doivent être surveillés puis vérifiés par des analyses microbiologiques et chimiques quantitatives (de confirmation) avant l'écoulement. Les différentes techniques développées ou optimisées dans cette thèse (HPLC/UV pour les résidus d'antibiotique, HPTLC pour les amines biogènes, ELISA ou GC/FID/MS pour la MT) peuvent être utilisées, en routine, pour la vérification des échantillons de poissons au niveau des laboratoires algériens.

RESULTATS

Tableau XXVIII : Maitrise des PCCs de la production et de la commercialisation de tilapias (*O. niloticus*) produits à Fat-Steppes.

	PCC	Limites critiques	Procédure de surveillance	Actions correctives	Vérification	Documentation
Etapas						
Alevinage	Résidus de la MT	Tolérance 0 pour la MT	Screening par ELISA*	Prolongement du grossissement de deux mois au minimum.	Confirmation par GC/MS	Tenue d'un registre de médication
Grossissement	Résidus d'antibiotiques	- Respect des LMR pour les antibiotiques (100 ppm pour l'acide oxolinique).	Screening microbiologique des résidus d'antibiotiques	Prolongement des délais d'attente d'un minimum d'une semaine en fonction de l'antibiotique.	Confirmation par HPLC/UV	-Tenue d'un registre de médication. -Sauvegarde des rapports d'analyses.
	Résidus de la MT	- Tolérance 0 pour la MT	Screening par ELISA *	Retardement de l'écoulement d'un minimum de deux mois.	Confirmation par GC/MS	-Tenue de fiche d'identification des lots.
Conditionnement & Transport	Prolifération bactérienne	Critères microbiologique (JORADP n°35, 1998) 05 jours à 4°C & 12 heures à 30°C.	Contrôle de la température	Renettoyage des caisses, visites médicales des opérateurs et port de tenue spéciale, stérilisation de l'eau pour la fabrication de la glace	Echantillonnage et analyse microbiologique (bactéries indicatrices et pathogènes)	Sauvegarde des : -rapports d'analyses. -des formulaires de surveillance. -certificats médicaux
Commercialisation	Prolifération bactérienne	- Critères microbiologique (JORADP n°35, 1998) FMAT et ENT < 10 ⁶ cfu g ⁻¹ .	- Vérification de la température d'entreposage. - Analyse organoleptique.	Saisie du lot	- Analyse biochimiques	- Certificat sanitaire des poissons. - Etiquetage.
	Formation de produits secondaires d'oxydation lipidique (aldéhydes)	- TBARS : 0,85 mg eq MDA / kg.			- Analyse microbiologique	
	Formations d'amines biogènes	- 05 jours à 4°C & 12 heures à 30°C. - ABVT : 35 mg N/100g Putrescine + Cadavérine < 200 ppm			- Etalonnage du thermomètre. - Vérifier les documents	

RESULTATS

Intrants						
Eau	Présence de pathogène	FMAT < 10 ⁴ UFT/ml Coliforme fécaux < 10 ³ UFT/m	Prélèvement 4 x / an et analyse microbiologique mensuel	- Renouvellement régulier de l'eau ** - Refiltration biologique et physico-chimique	Analyse microbiologique	Enregistrement des fréquences de renouvellement. Sauvegarde des rapports d'analyses
	Résidus d'antibiotiques	- Respect des LMR pour les antibiotiques (100 ppm pour l'acide oxolinique).	Screening microbiologique		Confirmation par HPLC/UV	
	Résidus d'hormones	Tolérance 0 pour la MT	Screening par ELISA *		Confirmation par GC/MS	
Aliment	Présence de pathogène	- Critères microbiologiques de l'aliment selon la norme algérienne NA-6115 (Moisissures < 10 ³ ufc/g, <i>Bacillus cereus</i> < 10 ⁴ ufc/g) - Endroit sec (humidité relative < 60%), abrité et à température ambiante < 20°C.	- Mesure de l'humidité relative du local de stockage. - Mesure de l'humidité de l'aliment. - Contrôle de l'A _w - Contrôle de la température.	- Réparation du réfrigérateur (si conservation réfrigérée) - Substitution du fournisseur d'aliment. - Changement de salle de stockage. - utilisation d'aliment sec (extrudé) dont l'humidité ne dépasse pas les 15% - Formation du personnel.	Analyse microbiologique	Formulaire d'inspection de l'aliment Sauvegarde des rapports d'analyses
	Résidus d'antibiotiques	- Respect des LMR pour les antibiotiques (100 ppm pour l'acide oxolinique).	Screening microbiologique	Identification et stockage de l'aliment à part pour un traitement ultérieur	Confirmation par HPLC/UV	
	Résidus d'hormones	Tolérance 0 pour la MT	Screening par ELISA *		Confirmation par GC/MS	

* : Utiliser la nouvelle méthode d'extraction optimisée pour un test ELISA dans le cadre de ce travail afin de dépister les résidus de la MT chez des juvéniles âgés de plus de 100 jours (10 jours d'incubation + 1 mois de traitement hormonal au maximum + 2 mois post traitement) et dans les échantillons d'eau.

** : Le renouvellement de l'eau signifie une alimentation régulière en eau filtrée au sein d'un circuit fermé doté d'un système de filtration mécanique et biologique.

DISCUSSION

DISCUSSION

1. Démarche HACCP :

Durant les deux dernières décennies, l'aquaculture mondiale a connu une impressionnante expansion. L'aquaculture est devenue un secteur de production animale à croissance annuelle très rapide avec un taux avoisinant 9,6 %. Elle représente une source importante de protéines animales de haute valeur nutritive (FAO, 2014). L'aquaculture compense les stocks halieutiques du monde qui ont atteint les limites d'exploitation. Les pays asiatiques (Chine, Vietnam, Indonésie, Thaïlande...etc) sont les plus actifs dans ce créneau et assure approximativement 90 % de la production globale d'aquaculture (FAO, 2012). Une part importante (> 50 %) des exportations (poissons entiers, filets ou poissons transformés) est destinée aux marchés européens et américains (Lupin, 1999). Afin de soutenir et faciliter ce commerce international, mais en même temps assurer la sûreté et la qualité des produits, les autorités compétentes imposent une harmonisation des politiques de la sécurité alimentaire le long de cette chaîne de production (de la mer à la table) (Josupeit *et al.*, 2001). Des analyses de risques et des systèmes de gestion de qualité ou des certifications basés sur le système HACCP sont exigés (OMS, 1999 ; Gandini *et al.*, 2009). L'HACCP est une approche internationalement convenue pour la gestion de la sécurité alimentaire, qui a été aussi adaptée afin de sauvegarder et de surveiller le bien-être des poissons élevés (Van De Vis *et al.*, 2012). Néanmoins, ce concept d'assurance et de management de qualité est nettement en avance dans le secteur de la transformation des produits aquacoles par rapport à celui des élevages (Reilly & Kaferstein, 1997 ; Magras *et al.*, 2005).

De ce fait, des stratégies appropriées devraient être développées par les aquaculteurs afin de contrôler les risques liés à leurs productions. Ces stratégies peuvent s'appuyer sur les différents codes d'usages pour les poissons et les produits de la pêche (Codex alimentarius, 2012a), pour réduire au minimum et maîtriser la résistance aux antimicrobiens (Codex Alimentarius, 2005) et pour une bonne alimentation (Codex Alimentarius, 2004), ainsi que sur le guide d'autocontrôle pour le secteur du poisson (AFSCA, 2011).

Dans ce contexte, notre étude contribue à l'élaboration, dans une première tentative, d'un modèle spécifique du système HACCP pour la tilapiculture (*O. niloticus*) en Algérie (Fat-Steppes). En effet, lors de l'évaluation de ces programmes préalables (PRP), nous avons constaté des points non conformes et des défaillances qui influencent la qualité hygiénique des tilapias produits. Le choix du site de la ferme aquacole est déterminant pour le bien-être et la santé animale (OMS, 1999 ; Garrett *et al.*, 2000). L'emplacement de l'exploitation algérienne de tilapiculture "Fat-Steppes" convient parfaitement pour ce genre d'activité. Elle est située dans une zone rurale isolée et elle puise son eau d'élevage à partir d'une source d'eau douce

DISCUSSION

(le chott El-Chergui), à haut débit et naturellement chaude. L'eau pompée à partir du chott subit une filtration mécanique et biologique avant d'alimenter les bassins des premiers stades de production à l'intérieur des serres qui fonctionnent en circuit fermé. Par contre, au niveau des étangs de grossissement des juvéniles de tilapia, des circuits ouverts sont utilisés. La qualité d'eau qui alimente ces étangs est tributaire du débit et de la fréquence de renouvellement de l'eau.

NB/ Les résultats de la qualité microbiologique et chimique de l'eau seront discutés plus loin lors de l'évaluation de ce danger.

Le non respect des bonnes pratiques d'hygiène lors du conditionnement et le flux insouciant du personnel au sein de la ferme peuvent être à l'origine de contaminations croisées des produits finaux. Huss *et al.* (2002) et Carbonera *et al.* (2011), ont démontré que des *Pseudomonas* sp. , des staphylocoques, des salmonelles et des coliformes thermotolérants pouvaient contaminer la chair du poisson à cause d'une mauvaise manipulation.

La formulation et la conservation de l'aliment destiné aux poissons nécessitent un savoir faire technique. Il est connu qu'en aquaculture la rentabilité de la production globale est très dépendante de la disponibilité et du coût des aliments (Azaza *et al.*, 2005). La farine de poisson est en général la composante majeure des aliments en aquaculture. En effet, elle est riche en acides aminés essentiels indispensables pour la croissance des poissons. Cette source conventionnelle de protéines représente 40 à 60 % des protéines totales dans les aliments standards pour les tilapias (NRC, 1993). Son prix d'achat élevé et l'irrégularité de sa qualité ont incité les producteurs à la substituer par des matières premières végétales (Kaushik *et al.*, 2004; Bamba *et al.*, 2008). Le tourteau de soja est le plus utilisé du fait de sa disponibilité, de la stabilité de son prix et surtout de sa bonne valeur nutritionnelle pour la plupart des poissons d'élevage (Kenan & Chris, 2005). Dans cette optique, au sein de la ferme de tilapiculture algérienne Fat-Steppes, l'aliment est fabriqué in situ avec des formules variées en fonction des besoins de chaque stade (alevins, juvéniles et adulte) de production. La farine de poisson est obtenue essentiellement à partir de stock de sardines (*Sardina pilchardus*) (vendu à bas prix en été). Ce poisson étant gras rend difficile la conservation de l'aliment extrudé formulé sans l'ajout d'antioxydants. De plus, il a été démontré par Hernandez *et al.* (2014) que la forme de l'aliment extrudé (une surface poreuse et une chambre à air internes) favorise le contact entre la graisse et l'oxygène dans l'air et la peroxydation lipidique est favorisée. De ce fait, le respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF) et l'incorporation des antioxydants naturels ou synthétiques est primordiale afin de ralentir ou d'arrêter la peroxydation lipidique et par

DISCUSSION

conséquent préserver la fraîcheur et l'attractivité de l'aliment. La vitamine E, la vitamine C et les flavonoïdes peuvent être utilisés comme antioxydants naturels et le BHT (butyl hydroxytoluène), BHA (butyl hydroxyanisol) et l'éthoxyquine comme antioxydants synthétiques (Blaszczyk *et al.*, 2013).

Un autre problème d'ordre technologique est à soulever dans les BPF, la substitution de la farine de poisson par des farines végétales (bons marché) pourrait affecter la croissance des poissons en raison de leur faible taux protéique, carence en acides aminés essentiels et la présence de facteurs antinutritionnels (Médale & Kaushik, 2009).

NB/ Les résultats de la qualité microbiologique et chimique de l'aliment seront discutés plus loin lors de l'évaluation de ce danger.

Pendant ces dernières décennies, la perception du consommateur vis à vis les produits aquacoles et les produits de la pêche a nettement évolué. Il est devenu plus exigeant en termes de qualité hygiénique et de qualité nutritionnelle (Rasco, 2010). Le tilapia se classe au 2^{ème} rang des poissons aquacoles les plus vendus au monde (FAO, 2012). Il est apprécié pour sa chair tendre, ses valeur gustative et nutritive, l'absence d'arêtes et pour son prix relativement abordable (Watanabe *et al.*, 2002). Lors de la caractérisation du profil nutritionnel du tilapia (*O. niloticus*) produit à Fat-Steppes, dans les étapes préliminaires de l'HACCP, nous avons démontré que la composition chimique de sa chair se caractérise par un taux normal de protéines (17,3 %). Des résultats similaires ont été rapportés par Ibrahim & El-Sherif (2008) et Emire *et al.* (2009). Il est connu que le pourcentage des protéines chez les poissons est relativement stable entre 17 % et 20 % (Lefèvre & Bugeon, 2008). Dans une étude rapportée par Tongnuanchan *et al.* (2011), ils ont démontré que le tilapia pouvait contenir un taux nettement plus faible de protéines (13,2 %). Dans la présente étude, il est démontré que le tilapia n'est pas une bonne source de lipide pour le consommateur. Le pourcentage des lipides est très faible (0,33 %), il est inférieur aux taux rapportés dans la littérature et dont les valeurs fluctuent de $0,98 \pm 0,01$ % à $2,72 \pm 0,23$ % (De Souza *et al.*, 2007; Ibrahim & El-Sherif, 2008 ; Suloma *et al.*, 2008; Emire *et al.*, 2009 ; Elagba & Al-Sabahi, 2011; Navarro *et al.*, 2012; Dhanapal *et al.*, 2012). Le taux des cendres du tilapia est relativement bas (< 0,40 %). Cette valeur est proche des valeurs rapportées dans la littérature (Ibrahim & El-Sherif, 2008 ; Emire *et al.*, 2009 ; Tongnuanchan *et al.*, 2011 ; Kulawik *et al.*, 2013). La proportion majeure du tilapia est dominée par l'humidité qui avoisine les 80 %. Cette valeur correspond bien aux autres travaux réalisés sur du tilapia fraîchement pêché (Ibrahim & El-Sherif, 2008 ; Emire *et al.*, 2009). Des taux plus importants (> 85 %) ont été rapportés par Tongnuanchan *et al.* (2011)

DISCUSSION

et Kulawik *et al.* (2013) qui ont analysé des échantillons congelés ayant certainement absorbés de l'eau durant leurs conservation (Kyra *et al.*, 1997).

Le profil nutritionnel en acide aminés et en acides gras du tilapia algérien est intéressant. En comparant nos résultats avec ceux de littérature, nous constatons que la composition en acides aminés et en acides gras varient considérablement entre les individus des tilapias analysés. En effet, les valeurs changent en fonction de l'âge, du sexe, de l'environnement, de la saison et de l'état physiologique (Médale, 2004). De plus, le régime alimentaire, qu'il soit naturel ou industriel, influence le profil nutritionnel du poisson (De Souza *et al.*, 2007; Elagba & Al-Sabahi, 2011; Navarro *et al.*, 2012). Le tilapia algérien (*O. niloticus*) représente une bonne source d'acides aminés essentiels tels que : la thréonine, la valine, la leucine, la méthionine, la isoleucine et la lysine, ...etc. Il peut aussi fournir un apport relatif en acides gras polyinsaturés (> 57 % des acides gras totaux) pour le consommateur algérien. La proportion des n-6 et n-3 ($39,60 \pm 1,18$ % et $18,33 \pm 0,59$ % des acides gras totaux respectivement) est assez importante, en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui sont connus pour la prévention des maladies cardiovasculaires et l'atténuation des processus inflammatoires (Lecerf, 2007 ; Calder *et al.*, 2011 ; Navarro *et al.*, 2012). D'après Osman *et al.* (2001) un ratio de 1/5 du rapport n-3/n-6 constitue un régime alimentaire sain pour l'homme. Dans la présente étude, le rapport n-3/n-6 était de $0,46 \pm 0,03$, cette valeur concorde bien avec l'étude réalisée sur du filet de tilapia rouge (*Oreochromis niloticus* x *Tilapia mosambicus*) par Karami *et al.* (2013).

Dans le cadre de notre étude nous avons ciblé quelques dangers précis. Endéans la phase d'élevage, la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau et de l'aliment ainsi que la manipulation des médicaments vétérinaires (antibiotiques et hormones couramment utilisés pour cet élevage) ont été déterminés comme des points critiques de contrôle (PCC). Ces dangers microbiologiques et chimiques correspondent parfaitement aux différents points critiques soulevés dans des plans HACCP préalablement établis pour différentes espèces aquacoles (Reilly & Käferstein 1997 ; Huss *et al.*, 2004 ; Bagumire *et al.*, 2009 ; Bush *et al.*, 2009). Dans la phase *post mortem* (conservation du tilapia après récolte), le point le plus critique, était l'altération rapide de la qualité sensorielle, microbiologique et biochimique du tilapia à cause des méthodes d'entreposage et de conservation dans les marchés en dépit de la santé publique. Cette étape de commercialisation est souvent critiquée par les scientifiques lorsque ils appliquent le système HACCP ou lorsqu'ils étudient la qualité microbiologique des poissons ou

DISCUSSION

filets vendus (Garrett *et al.*, 2000 ; Huss *et al.*, 2000 ; Giuffrida, 2003 ; Arvanitoyannis & Varzakas, 2009).

Dans notre travail, nous avons établi des stratégies analytiques fondées sur le screening et la confirmation des différents dangers chimiques et microbiologique susmentionnés. Des seuils limites ont été fixés et des mesures de surveillance et de vérification, techniquement simples et facilement transposables, ont été développées ou testées.

Le danger lié au portage de bactéries pathogènes et de parasites (trématodes) par les tilapias adultes a été jugé comme étant un risque acceptable qui pourrait être maîtrisé par des bonnes pratiques vétérinaires (BPV). En effet, en Algérie, un certificat sanitaire est impérativement délivré avant la commercialisation des tilapias. Les lésions superficielles seraient un motif de saisie lors de l'inspection vétérinaire. De plus, selon les habitudes alimentaires algériennes, le poisson se vend entier, frais non éviscéré, et il est consommé grillé, frit ou cuisiné. Ces trois modes de cuisson sont thermiques et permettent la destruction des éventuels parasites et bactéries contaminants la chair du poisson.

Toutefois, sous certaines conditions, les bactéries responsables de pathologies des poissons peuvent éventuellement infecter les humains, sans être nécessairement considéré comme un problème de santé publique majeur (Hastein *et al.*, 2006). Il a été rapporté que des bactéries, très redoutables pour les élevages de tilapias (forte contagion et mortalité importante), du genre *Streptococcus iniae* (Baiano & Barnes, 2009 ; Al-Harbi, 2011 ; Wang *et al.*, 2011 ; Haenen *et al.*, 2013), *Vibrio vulnificus* Biotype 2 (Mahmud *et al.*, 2010 ; Lo *et al.*, 2014) et *Mycobacterium marinum* (Sonda-Santos & Lara-Flores, 2012 ; Lara-Flores *et al.*, 2014) pouvaient affecter les tilapiculteurs et les manipulateurs de poissons en surinfectant des plaies ou des lésions cutanées préexistantes (dermo-hypodermite nécrosante, lésions granulomateuses et cellulite locale) ou encore évoluer en septicémie (Hastein *et al.*, 2006).

NB/ Les résultats de l'évaluation de chaque danger seront discutés séparément.

2. Stratégie analytique des résidus d'antibiotiques :

La présence des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires d'origine animale représente un risque chimique avéré pour le consommateur. La recherche scientifique a fourni plusieurs efforts dans le développement de techniques analytiques qui permettent de déceler les résidus des antibiotiques en particulier. L'analyse quantitative de ces derniers respecte une stratégie bien planifiée qui débute par un screening, le plus souvent c'est un test microbiologique qui est non spécifique. Ce test est suivi par une confirmation spécifique

DISCUSSION

par une technique enzymatique, immunologique ou chromatographique liquide. Reig & Toldra (2008) ont schématisé une procédure typique de l'analyse de résidus de médicaments vétérinaires dans la viande. Une autre stratégie avec un test post screening intermédiaire pour l'analyse des antibiotiques et des hormones dans les denrées alimentaires a été présentée par Bovee & Pikkemaat (2009).

La décision de la Commission 2002/657/CE, stipule qu'un test de screening est validé lorsque sa capacité de détection (CC β) est inférieure à la valeur de LMR de l'antibiotique d'intérêt. L'interprétation des résultats est traduite selon le terme conforme pour le résultat négatif et suspect d'être non conforme pour le résultat positif. Des directives ont été élaborées afin de standardiser la méthodologie du screening des résidus de médicaments vétérinaires et un guide (4^{ème} version) de la procédure de validation du screening a été rédigé par Gaudin & Sanders (2005). De plus, le CRL (Community Reference Laboratories Residues) a publié en 2010, des directives générales pour la validation des méthodes de dépistage de résidus des médicaments vétérinaires.

Dans ce contexte, pour notre étude des résidus d'acide oxolinique (quinolone fréquemment utilisée en tilapiculture) dans la chair et le sérum du tilapia, nous avons adapté une méthodologie analytique basée sur un screening microbiologique mettant en œuvre une seule boîte de gélose à pH6ensemencée avec *Bacillus subtilis* et une confirmation quantitative par LC-UV-MS.

Le screening d'ordre microbiologique a un grand intérêt analytique, son coût est abordable, sa mise en pratique est simple et le délai d'analyse est court. Le recours à cette méthode remonte à plusieurs décennies et les progrès accomplis ont vu varier les matrices, le nombre et la forme des géloses de culture (boîtes de Pétri ou ampoules), le pH des plaques, la souche bactérienne et le protocole d'extraction. En général, les souches les plus sollicitées sont : *Yersinia ruckeri* (Barker, 1994), *E.coli* (Choi *et al.*, 1999 ; Ashwin *et al.*, 2009 ; Sanz *et al.*, 2010), *Bacillus stearothermophilus* utilisée souvent dans les ampoules pour le Premi[®] Test (Stead *et al.*, 2004) ou le Delvotest[®] SP-NT (Stead *et al.*, 2008), *Klebsiella pneumoniae* (Donoghue & Schneider, 2003 ; Schneider & Donoghue, 2004), *Bacillus cereus* (Okerman *et al.*, 2007) dans l'analyse multi-résidus à 7 plaques combinée aux autres souches bactérienne et à différents pH.

La souche qui a servi pour notre screening, *Bacillus subtilis*, a la particularité d'être sensible à plusieurs antibiotiques et surtout les fluoroquinolones et les tétracyclines (Dang *et al.*, 2010, 2011). Elle est une souche de choix pour la majorité des tests européens de référence (Belgian Kidney test, New Dutch Kidney test et EU 4-plate test).

DISCUSSION

Les résultats obtenus dans notre expérience, révèle que le test de screening basé sur l'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* ensemencée dans une gélose Agar pH 6 et incubé à 32°C pendant 18 heures est concluant.

Les paramètres de performance (exactitude, sensibilité et spécificité) de la méthode pour la détection des résidus de deux familles d'antibiotiques à savoir ; les fluoroquinolones et les tétracyclines sont satisfaisants. Toutes les valeurs des capacités de détection des huit antibiotiques d'intérêt sont inférieures à leurs LMR respectives.

Le protocole d'extraction optimisé (Dang *et al.*, 2010) , c'est -à- dire reconstitution de l'extrait de résidu dans 200 µl, améliore considérablement la sensibilité de la méthode.

Les paramètres de performances de la technique sont remarquables pour tous les antibiotiques étudiés : la sensibilité est d'un minimum de 95 %, l'exactitude d'un minimum de 97,5 % et la spécificité est de 100 %.

En ce qui concerne particulièrement l'acide oxolinique, les paramètres ; exactitude, sensibilité et spécificité du test sont de 100 % et la capacité de détection (CCB) est de 75 µg/kg, qui est inférieure à LMR (100 µg/kg).

Les résultats obtenus concordent bien avec les résultats montrés par Dang *et al.* (2010). Néanmoins, un effet matrice est constaté, car le même protocole appliqué sur le poisson et sur la crevette, donne des capacités de détection différentes : la CCB de l'acide oxolinique est de 0,70 fois la LMR chez la crevette et elle est de 0,95 fois la LMR chez le tilapia.

Nos résultats sont en concordance avec les résultats de Stead *et al.* (2004) qui ont démontré que l'extraction préalable des résidus d'antibiotiques par un mélange de solvants (acétonitrile/acétone) permettait d'améliorer les limites de détection du test de screening Premi[®] Test par rapport à l'application directe du jus de viande de porc dépisté par le même test.

Lors du screening microbiologique des produits aquacoles (surtout chez les crustacés), l'effet inhibiteur du lysozyme (Xing *et al.*, 2009) pourrait interférer avec l'effet antibactérien (Dang *et al.*, 2010) et ainsi fausser le résultat (faux positif) en élargissant la zone d'inhibition. Le fait de reconstituer l'extrait d'antibiotique dans du méthanol inactive le lysozyme (Dang, 2007).

Les résultats obtenus lors de la validation de la méthode de screening et lors de l'analyse des échantillons de tilapia contaminés révèlent que la diffusion des antibiotiques dans la gélose est influencée par le pH du milieu. Selon la nature de l'antibiotique, le fait d'alcaliniser le milieu (gélose pH6) en ajoutant 20 µl de NaOH 1%, élargit ou rétrécit la zone d'inhibition. Il se trouve que les fluoroquinolones, étant des acides forts, sont sous forme ionisée ($\text{COO}^- + \text{H}^+$) et diffusent mieux dans ce milieu alcalinisé. C'est pour cette raison que pour

DISCUSSION

l'enrofloxacin et la ciprofloxacine la largeur de la zone d'inhibition est plus grande en présence de NaOH.

Par contre, les tétracyclines (bases) sont sous leur forme non ionisée, en l'occurrence, leur diffusion est limitée ou inhibée et la largeur de la zone d'inhibition du deuxième disque (en présence de NaOH) est petite ou nulle. Ce paramètre (NaOH) peut être distinctif pour départager les deux familles d'antibiotiques étudiées.

En ce qui concerne l'acide oxolinique, les 20 µl de NaOH 1 % ajoutés sur le deuxième disque de cellulose, n'ont pas d'effet marquant. Sa nature d'acide faible avec un pKa = 6,9 (presque neutre) limite son ionisation. Dans ce cas de figure, on pourra utiliser un seul disque chargé de l'extrait d'antibiotique pour l'analyse. Ces résultats concordent bien avec ceux de Dang *et al.* (2010).

L'optimisation de l'analyse chromatographique quantitative HPLC-UV-MS est pertinente pour la quantification des résidus d'acide oxolinique dans la chair du tilapia, néanmoins, à cause de la charge importante de l'acide oxolinique dans la majorité des échantillons traités nous étions obligés de se limiter à la détection UV. Le spectromètre de masse étant un appareillage fragile, il a été vite encrassé par les échantillons et sa sensibilité a été perturbée. Une dilution des échantillons ou une diminution de la prise d'essai étaient possibles pour continuer à utiliser ce mode de détection (MS). Nous avons d'ailleurs réadapté notre courbe de calibration à dix niveaux de concentrations (0- 10 fois la LMR) et notre prise d'essai a été réduite de moitié (500 mg pour la chair et 250 µl pour le sérum du tilapia).

Ces mesures n'étaient pas suffisantes pour obtenir des résultats corrects en MS. Une optimisation plus fine aurait été nécessaire mais n'a pu être réalisée faute de temps. La détection MS aurait permis une sensibilité plus fine, des limites de détection et de quantification inférieures à celles de la détection UV. En plus de la détection multi-analytes en fonction de la masse molaire des molécules d'intérêt recherchées.

La méthode chromatographique de base est une technique appropriée aux fluoroquinolones (Danyi *et al.*, 2011) avec une détection MS. La détection UV n'avait jamais été utilisée au laboratoire. Elle a été optimisée et réévaluée en termes de justesse, fidélité, limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), linéarité, spécificité et sélectivité selon les recommandations de la décision de la commission 2002/657/CE (EC/2002). Les paramètres de performances obtenus pour l'analyse de la chair du tilapia sont satisfaisants.

En comparaison avec les protocoles d'extraction et de purification dans diverses matrices, la technique utilisée dans le présent travail est pertinente et la méthode est considérée comme

DISCUSSION

rapide (Van Hoof *et al.*, 2005 ; Bailac *et al.*, 2006 ; Christodoulou *et al.*, 2007 ; Stoilova & Petroca, 2010 ; Chafer-Pericas *et al.*, 2011).

Quant au sérum, la méthode a été mise au point en combinant le protocole développé pour la chair de poisson (Danyi *et al.*, 2011) et celui proposé par Garcés *et al.* (2006) et Tu *et al.* (2006) pour le sérum du porc et du crabe respectivement.

La technique élaborée a démontré de bonnes performances analytiques. La linéarité de la relation dose-réponse est correcte dans les deux matrices (chair et sérum). Les courbes dose-réponse se superposent, ce qui indique que l'effet matrice est similaire dans le cas de la chair et dans le cas du sérum. Ce résultat concorde avec le résultat de Tu *et al.* (2006) décrivant une méthode de détection des résidus de l'acide oxolinique dans la chair de crabe par HPLC couplée à une détection à fluorescence.

Une nouvelle technique élaborée par Choi *et al.* (2011) semble être plus rapide et plus simple pour la détermination des fluoroquinolones par HPLC-FLD dans le sérum de porc directement après extraction et sans passer par la phase de purification.

La cinétique d'élimination de l'acide oxolinique a été étudiée dans deux lots de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Les résultats de la cinétique d'élimination de l'acide oxolinique dans les deux matrices (chair et sérum) présentent le même profil. Dès les premières heures du traitement, la concentration en acide oxolinique dans le sérum dépasse la LMR. Puis la concentration continue à croître jusqu'au pic atteint et estimé entre la 10^{ème} et 12^{ème} heure du premier jour de traitement, pour fluctuer tout au long de la phase de contamination. La décontamination connaît un décroissement rapide de la concentration jusqu'au dernier jour (8^{ème} jour post-traitement). La concentration en acide oxolinique diminue en dessous du seuil de tolérance (LMR) dans le premier lot de poissons, par contre le deuxième lot reste plus concentré.

La concentration sérique en acide oxolinique décline plus rapidement que celle dans le muscle. Dans la littérature, la pharmacocinétique de l'acide oxolinique chez les espèces marines confirment que l'élimination de l'antibiotique est plus rapide dans le sérum, suivi du muscle, la peau, la bile et le foie (Poher *et al.*, 1997 ; Poher & Blanc, 1998 ; Rigos *et al.*, 2003 ; Uno, 2004 ; Samuelsen, 2006). Ces résultats sont en concordance avec la cinétique d'élimination dans les deux matrices étudiées dans notre travail.

Il est difficile de comparer avec la majorité des publications qui abordent généralement l'aspect pharmacocinétique ou de déplétion de l'acide oxolinique chez d'autres espèces marines de poisson. En plus, notre objectif principal diverge et s'oriente vers la méthodologie analytique. Parmi les rares études réalisées chez le tilapia, une seule publication (Paschoal *et al.*, 2009)

DISCUSSION

rapporte une analyse LC-ESI-MS-MS QToF des fluoroquinolones sur des filets blancs de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Paschoal *et al.* (2009) ont développé le même protocole analytique (extraction et purification) que celui appliqué dans notre travail. Les performances de la méthode pour détecter l'acide oxolinique (quinolone) dans la chair du tilapia (filet) en termes de linéarité, fidélité et justesse sont autant satisfaisantes que celles démontrées dans notre analyse. Les deux méthodes présentent une bonne linéarité ($R = 0,99$), une fidélité (reproductibilité) inférieure à 20 % et une justesse dans l'intervalle toléré (-20 % à +10 %).

Feng *et al.* (2008) ont rapporté que le florfénicol est rapidement éliminé dès le 3^{ème} jour suivant la première administration médicamenteuse de 10 mg/kg chez des tilapias (*Oreochromis niloticus*) élevés à 28°C. Cette étude propose une antibiothérapie par un analogue du chloramphénicol qui a une élimination rapide et un large spectre antibactérien en comparaison avec les fluoroquinolones (l'acide oxolinique en particulier).

En ce qui concerne l'efficacité de la stratégie analytique screening-confirimation, les résultats montrent une excellente corrélation entre résultats de screening et de confirimation puisque le seuil de positivité et le seuil de d'acceptabilité (LMR), respectivement, sont atteints dans les mêmes délais que dans le cadre de l'expérience de contamination du tilapia par l'acide oxolinique (lot 1).

Du point de vue quantitatif, le screening et la confirimation diffèrent. Le screening microbiologique a subi une saturation persistante de la réponse dès le premier jour de traitement dans le lot 1 qui n'a commencé à décliner que dans la phase de décontamination pour atteindre le seuil de positivité (1,5 mm de largeur de la zone d'inhibition) au jour 8 après l'arrêt du traitement. Cette saturation indique des niveaux très élevés en acide oxolinique dans la chair de tilapia mais de façon non proportionnelle d'où la difficulté d'estimer des valeurs de concentrations réelles dans les échantillons de chair traités.

La confirimation chromatographique quant à elle, a permis une mesure quantitative en µg/kg, ce qui permet de mieux suivre la cinétique d'élimination et en l'occurrence de déterminer les délais d'attente. La cinétique d'élimination de l'acide oxolinique dans le premier lot montre une concentration importante d'acide oxolinique dès les premières heures du traitement qui atteint son pic 10 heure après le début du traitement, les valeurs fluctuent le long des six jours de traitement puis baissent dans la phase de décontamination jusqu'à atteindre le seuil d'acceptabilité au 8^{ème} jour de décontamination.

Ce résultat est en concordance avec l'étude réalisée par Poher *et al.* (1997) sur la pharmacocinétique de l'acide oxolinique à une dose de 10 mg/kg de poids vif administré par voie intraveineuse chez le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*). C'est probablement la seule

DISCUSSION

étude qui a combiné la même stratégie analytique, screening (une seule plaque pH6ensemencée avec *E.coli*) et une détection HPLC-UV mais, dans le sérum.

Pour notre étude, en se fiant aux résultats obtenus pour le premier lot, le délai d'attente pour le traitement du tilapia avec une dose de 12 mg/kg d'acide oxolinique est d'un minimum de 8 jours. Cette conclusion concorde avec les études préalables sur la même molécule pharmaceutique chez d'autres espèces que le tilapia, où le délai d'attente minimal est de 6 jours (Archibault *et al.*, 1988 ; Guichard, 2000 ; Samuelson, 2006). Notons que le fournisseur (Virbac) recommande un délai d'attente de 6 jours pour l'acide oxolinique (Oxomid 20[®]) utilisé en aquaculture.

L'enrofloxacin (fluoroquinolone) à une dose de 50 mg/kg administrée par voie orale chez le tilapia du Nil pendant une semaine de traitement a nécessité 22 jours de délai d'attente (Xu *et al.*, 2006).

Le profil général de réponse est similaire dans le deuxième lot de poissons, que ce soit pour le résultat du screening ou de la confirmation. Le niveau de concentration en acide oxolinique est très élevé et reste au dessus du seuil de tolérance (LMR : 100 µg/kg) pour la confirmation et au dessus de 1,5 mm pour le screening (seuil de positivité). Cette différence de concentrations entre les duplicats pourrait être due à la différence de poids entre les deux lots, et à la différence de biomasse qui en résulte, qui influencent directement la dose du traitement (0,5 % de la biomasse). Peuvent également intervenir, des paramètres extrinsèques (oxygénation et température), des paramètres intrinsèques (état physiologique du poisson), le pH dans l'estomac qui influence l'absorption de l'antibiotique (Guichard, 2000) et les phénomènes de dominance (cannibalisme) au sein des aquariums. D'un autre côté, la modélisation statistique a révélé qu'il n'existait pas de différence significative entre le screening et la confirmation chromatographique des échantillons de chair de tilapia du premier et du second lot.

Le screening microbiologique peut être pratiqué pour le traitement qualitatif d'un nombre important d'échantillons dans le cadre du contrôle des produits issus de la pêche ou de l'aquaculture, mais une confirmation chimique est indispensable pour décider de la conformité du lot. L'analyse de confirmation est également indispensable dans le cas d'études réalisées dans le but de déterminer un délai d'attente.

Idéalement, Stoltz (2008), recommande pour la détermination du délai d'attente, "laps de temps entre la fin du traitement médicamenteux et l'abattage de l'animal qui permet d'obtenir des concentrations en résidus inférieures aux LMR", l'ajout d'une marge de sécurité de 30 % en plus de la date d'abattage la plus proche, pour laquelle toutes les concentrations résiduelles sont inférieures aux LMR. Cela correspond à 70 µg/kg au lieu de 100 µg/kg dans le

DISCUSSION

cas de l'acide oxolinique. Si on se réfère aux résultats obtenus à partir du 1^{er} lot, on devrait fixer un délai d'attente de 9 jours au minimum au moment où la concentration en acide oxolinique diminue en dessous des 70 µg/kg.

3. Evaluation des résidus de la 17 α -méthyle testostérone :

L'effet androgénique de la MT dans le développement des caractères sexuels masculins (phénotype mâle) a été confirmé dans cette étude (97,78 % de males contre uniquement 2,22 % de femelles). Les mêmes résultats ont été préalablement obtenus par Romerio *et al.* (2000) et Marjani *et al.* (2009), lors de la distribution d'aliments médicamenteux dosés respectivement à 60 mg et 75 mg de MT/kg d'aliment. Des populations masculines à 100 % ont été obtenus avec des doses de 40 mg MT/kg d'aliment dans un circuit fermé (Abucay & Mair, 1997), 50 mg MT/kg d'aliment (Bhandari *et al.*, 2006) et 70 mg MT/kg d'aliment (Asad *et al.*, 2010). Une moyenne de population masculine à 95 % a été rapportée par Guerrero (1975), lorsqu'il a traité des larves de tilapias avec 30 mg MT/kg d'aliment. Un maximum de 93,7 % de mâles a été décrit par Celik *et al.* (2011) tout en appliquant différentes doses de MT dans l'aliment (de 20 jusqu'à 60 mg MT/kg).

Dans cette étude, la cinétique résiduelle post traitement de la MT dans la chair du tilapia décline rapidement à partir d'une concentration maximale de 2,19 µg/kg (lot 1) jusqu'à des concentrations indétectable ($< LOD = 0,09 \mu\text{g/kg}$) au bout de 60 jours de cessation du traitement hormonal. Les échantillons issus d'élevage réel de tilapiculture en Algérie étaient forcément négatifs après une durée d'élevage dépassant les 5 mois. Ces résultats concordent bien avec de nombreuses études antérieurement réalisées pour évaluer l'accumulation de la MT chez les poissons entiers ou au niveau des filets. Le constat global après une trentaine d'année d'étude, démontre que la clairance de la MT est très rapide chez les différentes espèces de poissons. D'après Fagerlund & Dye (1979) et Johnstone *et al.* (1983), chez le saumon (*Oncorhynchus kisutch*), chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) et chez la truite (*Salmo gairdneri*) respectivement, la présence de la MT radioactive est supérieure à 95 % dans les viscères et elle n'est plus détectable après 50 heures post-traitement. Goudie *et al.* (1986) ont rapporté que les juvéniles de tilapia (*Oreochromis aureus*) traités par la MT radioactive pendant 30 jours présentent une déplétion rapide de la radioactivité dans le muscle. Cravedi *et al.* (1993) ont confirmé que la MT est rapidement biotransformée et excrétée via les excréments et les branchies chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) en se basant sur des expériences de radioactivité pour évaluer la pharmacocinétique de la MT et de ses métabolites. Green & Teichert-Coddington (2000) ont réalisé une analyse de risque de l'utilisation de la MT aux USA sur

DISCUSSION

l'environnement et la santé publique. L'évaluation de la régression de la déplétion de la radioactivité a révélé qu'il n'existe pas d'effets négatifs des résidus de l'hormone sur la santé publique. Les concentrations de la MT et de ses métabolites chez le *tilapia* sp. passent sous le seuil de 100 mg/kg après un délai d'attente de 8 à 40 jours et sous le seuil de 10 mg/kg dans la carcasse après un délai 6 à 50 jours. Les mêmes auteurs en 2001, en analysant des filets de tilapia, ont estimé que la concentration de la MT dans une portion de tissu comestible (57 à 143 g de filet) est infime et exprimée en ppt (partie par trillion), soit 1,2 à 3,4 ng de MT après un délai d'attente de 21 jours. De même, Vick & Hayton (2001) ont démontré lors d'une étude pharmacocinétique de la MT chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) que sa biodisponibilité par voie orale serait de 70 % et que sa demi-vie serait de 57 heures, ce qui renforce la conclusion de la déplétion rapides de la MT et de l'efficacité de l'aliment médicamenteux imprégné de la MT. Plus récemment, Rizkalla *et al.* (2004) a rapporté que les échantillons de tilapia (*O. niloticus*) monosexes, commercialisés à un poids moyen de 300 g (équivalent à 5 mois d'élevage), ne diffèrent pas des échantillons de contrôle (non traité) et les concentrations de la MT ont été inférieures au seuil toléré de 3 mg/kg. Dabrowski *et al.* (2004) ont démontré la chute rapide de la concentration de la MT à partir de 3 µg/kg jusqu'à 0,5 µg/kg au bout de 8 semaines de délai d'attente. Ce dernier résultat a été confirmé dans notre étude, où la concentration de la MT est passée sous le seuil de 0,09 µg/kg au bout de deux mois de délai d'attente.

Chu *et al.* (2006), ont montrés que la concentration de la MT dans les filets de tilapia (*Oreochromis sp.*), de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de saumon Atlantique (*Salmo salar*), nourris avec des aliments médicamenteux dosés à 30 mg/kg pendant 28 jours, était de 0,13 mg/kg après 14 jours de délai d'attente et passait en dessous du seuil de quantification (0,04 µg/kg par LC/MS) après 3 semaines de cessation du traitement hormonal. Guerrero (2008) a démontré que les concentrations de l'hormone MT chutent à un niveau normal, 5 jours après l'interruption de l'alimentation médicamenteuse. Khalil *et al.* (2011) et Hasheesh *et al.* (2011) ont démontré que la concentration sérique de la MT diminue rapidement est passe sous le seuil toléré de 3 mg/kg uniquement après 3 mois d'élevage. Des examens histologiques ont révélé des sections normales des muscles des poissons traités et de contrôle, aucun changement structural, ni de traces d'accumulation de l'hormone n'ont été décelés tout au long de l'expérience (8 mois d'étude).

Notre étude a démontré que les échantillons d'eau libérée à partir de l'écloserie et des deux circuits fermés étaient inoffensifs pour l'environnement. La concentration de la MT était nulle (sous le seuil de détection par ELISA ; 0,09 µg/kg) dans les échantillons prélevés en

DISCUSSION

raison de l'influence de la filtration mécanique et microbiologique que l'eau a subie dans les deux circuits fermés utilisés durant l'expérience au CEFRA. L'impact des stéroïdes sur l'environnement reste un sujet épineux et les opinions des scientifiques sont controversées. Dès la fin des années quatre-vingt-dix, des équipes américaines (Pond Dynamics/Aquaculture CRSP Management Office- Oregon State University) ont lancé différents projets pour mieux cerner l'impact environnemental de l'hormone 17 α -méthyle testostérone. Fritzpatrick *et al.* (2000) ont rapporté que la MT persistait plus de 8 semaines dans l'environnement. Des révélations préalables (Abucay *et al.*, Abucay et Mair, 1997) ont démontré que la persistance de la MT dans l'environnement pouvait induire une inversion sexuelle accidentelle chez d'autres alevins de tilapias n'ayant pas subi de traitement hormonal dans des fermes de tilapiculture voisines. Le même constat a été rapporté par Hulak *et al.* (2008) sur un élevage de carpes communes (*Cyprinus carpio* L.). Par ailleurs, la MT peut être convertie et métabolisée en œstrogène et induire la féminisation des alevins (Rinhard *et al.*, 1999). Phelps *et al.* (1999) et Contreras-Sanchez *et al.* (2001) ont démontré que suite à un traitement classique des juvéniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) avec la MT à une dose de 60 mg/kg pendant 28 j, la concentration moyenne de la MT est de l'ordre de 4,46 pg/g dans l'eau, elle est de 9,7 pg/g dans le sol et de 4,6 pg/g dans les sédiments après 20 jours post-traitement. Ces valeurs sont très minimes et la majorité des champignons et des bactéries peuvent métaboliser ce stéroïde. Green &Teichert-Coddington(2000) a démontré que la MT présente dans l'eau est rapidement diluée en raison de la photo-oxydation et de la dégradation bactérienne. Les hormones stéroïdiens dans l'eau, sont rapidement absorbées dans les sédiments, ou sont réduits en des composés inorganiques via la minéralisation. Les concentrations des hormones ont été considérablement réduites, de 166 à 7 ng/l pour la MT et de 73 à 2 ng/l pour l'œstrogène suite à une filtration à travers un filtre de gravier et de sable (Shore & Semesh, 2003). White *et al.* (2006) ont rapporté que les concentrations des hormones diminuent suite à une combinaison de la photolyse, de la dégradation microbienne, de l'absorption par les plantes, de la sorption du sol ou de la séquestration. Récemment, Contreras-Sanchez (2010) a rapporté que la MT dans les sédiments peut être éliminée et nettoyée rapidement du système grâce à des stérilisateur de type UV, à la lumière solaire ou encore au charbon actif. Les concentrations étaient inférieures à 5 ng/ml dans l'eau au bout de 48 heures. Dans la même année (2010) dans une expérience testée au laboratoire, le même auteur a démontré que *Bacillus cereus* et *Pseudomonas fluorescens* dégradent 99 % de l'hormone dans l'eau d'aquarium après 20 jours de traitement. De plus, il a suffi uniquement 16 jours à

DISCUSSION

Pseudomonas aeruginosa pour dégrader 97 % de l'hormone. Homklin *et al.* (2011, 2012) ont démontré que la majorité des bactéries pouvaient biodégrader les stéroïdes.

Dans cette étude, nous avons démontré que la stabilité de l'aliment médicamenteux (65 mg MT/kg) pouvait durer au moins un mois à température réfrigérée (4°C). Ceci est en accord avec Barry *et al.* (2007) préconisant plusieurs mois de conservation de l'aliment imprégné de MT à 4°C. Une attention particulière doit être reportée à l'égard de l'identification et la conservation séparée de l'aliment médicamenteux par rapport à l'alimentation ordinaire afin d'éviter toute contamination accidentelle (Macintosh, 2008).

Malgré la déplétion et la métabolisation rapide de la MT et malgré la biodégradation quasi totale de ses résidus dans l'eau, le traitement hormonal à la MT pour la masculinisation des juvéniles de tilapias reste une procédure risquée pour le consommateur et l'environnement. L'Algérie et les autres pays (pays africains, asiatiques et d'Amérique latine) qui pratiquent légalement cette technique (utilisation de la MT) de production de stocks masculins de tilapia doivent songer à la remplacer par une autre technique plus saine s'ils désirent exporter leurs produits vers l'Union européenne, le Canada et les USA. Une réglementation stricte vis-à-vis de l'utilisation de certaines substances à effet hormonal ou thyrostatique et des substances beta-agonistes dans les spéculations animales y est instaurée depuis 1996 et une tolérance zéro y est pratiquée (EU, 2003). Dans l'attente d'une harmonisation internationale des textes législatifs concernant la production des denrées alimentaires (aquaculture compris), les pays tiers doivent incontestablement pratiquer de bonnes pratiques aquacoles (BPA) indispensables et indissociables lors du traitement hormonal à la MT en tilapiculture. Les aquaculteurs sont tenus de limiter la dose de la MT à 65 mg/Kg d'aliment; limiter le traitement à une durée maximale de 28 jours successifs aux alevins de tilapias âgés de 10 jours post éclosion; préparer soigneusement l'aliment médicamenteux en portant des masques et des gants; identifier et conserver séparément cet aliment médicamenteux, prolonger la phase de grossissement au delà de 4 mois post traitement afin de garantir la salubrité de la chair du tilapia des résidus de la MT, et enfin recycler ou filtrer l'eau rejetée à partir des éclosiers afin de limiter l'impact environnemental (Macintosh, 2008 ; Hasheesh *et al.*, 2011 ; Dauda *et al.*, 2014).

Il existe d'autres techniques alternatives au traitement hormonal permettant d'obtenir des stocks monosexes mâles de tilapias avec des pratiques plus saines et qui ne présentent aucun risque chimique pour le consommateur et l'environnement, parmi lesquelles figurent :

- **Le sexage manuel (tri)** : c'est une technique simple qui a été largement utilisée dans le passé. Elle consiste à sexer manuellement les alevins de tilapia ayant atteint un stade sexuellement différencié par examen de la papille urogénitale. Cette méthode est toutefois

DISCUSSION

laborieuse en main d'œuvre, stressante pour le poisson et souvent conduit à des erreurs de sexage (de l'ordre de 20 %) lorsqu'on travaille sur des quantités importantes de poissons. Elle induit par ailleurs une perte de poissons et d'aliment, les femelles étant jetées (Penman & McAndrew, 2000 ; Beardmore *et al.*, 2001).

- **L'hybridation interspécifique** : l'hybridation de plusieurs espèces de tilapia (par exemple le croisement de : *O. niloticus* × *O. aureus*) conduit à une progéniture caractérisée par une proportion élevée (90 à 100 %) de mâles. Le principal désavantage de cette méthode est la nécessité de maintenir une souche pure de géniteurs (Delvin & Nagahama, 2002).

- **L'inversion thermique du sexe** :

L'effet masculinisant de la température sur la différenciation sexuelle a été démontrée chez diverses espèces de tilapia et un hybride (Baroiller & Clota, 1998 ; Desprez & Mélard, 1998 ; Wang & Tsai, 2000). La thermosensibilité du tilapia est très précoce (12 h après la fécondation) et apparaît bien avant le développement des gonades présomptives (Rougeot *et al.*, 2008). Les hautes températures (> 32°C – 34°C) influence le mécanisme complexe de différenciation sexuelle et permettent d'obtenir plus de 90 % d'individus mâles (Tessema *et al.*, 2006; Wessels & Hörstgen-Schwark, 2007 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009 ; Blazquez & Somosa, 2010).

- **L'utilisation de super-mâles(YY) :**

Les super-mâles (YY) sont obtenus à travers l'application de manipulations génétiques relativement simples de croisement en combinant féminisation et test de la descendance (Mair *et al.*, 1997), afin de produire de nouveaux mâles de génotype YY (soit avec 2 chromosomes sexuels mâles) au lieu des habituels mâles de génotype XY (Fuentes-Silva *et al.*, 2013). La reproduction entre des super-mâles de génotype YY avec des femelles XX débouche sur une descendance composée exclusivement de mâles XY (100 % mâle).

4. **Qualité microbiologique et chimique des aliments et des eaux d'élevage :**

Les conditions expérimentales au CEFRA étaient favorables pour le bon déroulement de l'inversion sexuelle des juvéniles de tilapia par la MT. La qualité physico-chimique de l'eau était acceptable et compatibles aux normes idéales pour l'élevage du tilapia qui sont prodiguées par Hasheesh *et al.* (2011). En concordance avec les résultats d'Asad *et al.* (2010), le taux de survie dans l'ensemble des aquariums expérimentaux était de 100 %, ce qui indique que le traitement hormonal n'affecte pas la survie des tilapias.

En aquaculture, les bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène sont primordiales pour la survie, le bien être et la croissance des poissons et (Khalil *et al.*, 2011). La qualité

DISCUSSION

microbiologique de l'eau affecte principalement la charge bactérienne du poisson et peut véhiculer toute sortes de contaminants chimique (polluants organiques persistants) et biologique (virus, parasites, bactéries et champignons) (Cole *et al.*, 2009 ; Bosma *et al.*, 2011). De ce fait, la qualité microbiologique et chimique de l'eau est souvent considéré comme un point critique de contrôle (Khamboonruang *et al.*, 1997 ; Anh *et al.*, 2010 ; Bush & Duijf, 2011). L'analyse microbiologique et physicochimique des échantillons d'eau prélevés à partir de la ferme de tilapiculture "Fat-Steppes" nous a révélé que cette eau était de mauvaise qualité. Pratiquement, tous les critères d'acceptabilité ont été dépassés. La flore mésophile totale (indicatrice de pollution) était supérieure à 10^6 UFC/ml, les coliformes totaux étaient supérieurs à 10^5 UFC/ml, les coliformes fécaux (indicateurs fécaux à partir des fèces d'animaux à sang chaud) et les streptocoques fécaux (témoins de pollution fécale) étaient supérieurs à 10^4 UFC/ml en moyenne. Les clostridies sulfito-réducteurs étaient supérieures à 10^3 UFC/ml. Ces dernières sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale. La forme spore, beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de détecter une pollution fécale ancienne ou intermittente (Rodier *et al.*, 2009). En plus de ces germes indicateurs, des bactéries pathogènes (*E. coli*, les staphylocoques, les salmonelles et les shigelles) étaient présentes à des taux importants, en particulier les *Pseudomonas* spp. Ce profil microbiologique de l'eau peut être expliqué par la contamination à partir des fermes agricoles voisines qui pratiquent des élevages bovins et ovins et contaminent le chott "El-Chergui" de proximité. De plus, aucun système de filtration d'eau à partir des étangs (circuit ouvert) n'a été prévu dans la ferme et les bassins ne sont pas conçus convenablement (absence d'un plan incliné). En raison de cette défaillance, les charges de production ont été augmentées lors de l'utilisation des pompes d'évacuation de l'eau. Ce qui a incité l'aquaculteur à minimiser les fréquences de renouvellement d'eau. En comparaison avec la littérature, l'eau de la ferme aquacole Fat-Steppes était trop polluée. Dans une étude bactériologique de l'eau saumâtre d'étangs d'élevage de tilapia en Arabie Saoudite, Al-Harbi & Uddin (2005) ont révélé que la flore mésophile totale aérobie (FMAT) a atteint un maximum de $1,1 \times 10^4$ UFC/ml dont les bactéries Gram négatives (87 %) en particulier les *Vibrionacea* ont prédominé. Ceci a fortement influencé la composition bactérienne des branchies et l'intestin des tilapias produits. Mandal *et al.* (2009) ont rapportés des valeurs acceptables de la qualité microbiologique de l'eau d'étang de tilapia au Bangladesh : la FMAT a été de l'ordre de $4,1 \times 10^6$ UFC/ml, les coliformes totaux ont été de l'ordre de $3,2 \times 10^4$ UFC/ml, des coliformes fécaux ont été de l'ordre de 200 UFC/ml dont *E. coli* a été de l'ordre de 4,2 UFC/ml. Macedo *et al.* (2011) ont rapporté que la saison influence aussi la charge des coliformes

DISCUSSION

thermo-tolérants des eaux dans les étangs d'élevage brésiliens. Il s'avère que les teneurs en coliformes totaux sont supérieures pendant les périodes pluvieuses (4×10^6 UFC /100 ml) que lors des périodes sèches (8×10^2 UFC/100 ml). Des résultats similaires ont été confirmés par Santos *et al.* (2012) lors de l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'élevage et sa corrélation avec les examens histopathologique des branchies de tilapias au Brésil. Il s'avère que les coliformes affectent les tissus des branchies des tilapias. Mara & Cairncross (1989) et Pillay (1990) ont révélé que lorsque la charge bactérienne en flore totale aérobie dépassait les 5×10^4 UFC/ml, des bactéries pathogènes pourraient se retrouver dans le muscle du poisson. Ces auteurs considèrent que ce dernier seuil représente la limite des barrières défensives normales du poisson. Il a également été démontré que l'invasion des muscles du poisson par des bactéries pathogènes est susceptible de se produire lorsque les charges respectives des coliformes fécaux et des salmonelles au sein des étangs d'élevages dépassaient les 10^4 et 10^5 UFC/100 ml. L'eau d'élevage du tilapia est souvent réutilisée pour l'irrigation et la fertilisation de l'agriculture (Fox *et al.*, 2012). Cette pratique a été condamnée par plusieurs scientifiques (Blumenthal *et al.*, 2000 ; Doyle & Ericson, 2006) ainsi que par l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) (1989) à cause des risques de contaminations croisées engendrées chez les agriculteurs, les aquaculteurs et dans le voisinage. En conséquence, l'OMS a recommandé un seuil de 10^3 UFC/100ml pour les coliformes fécaux dans les étangs d'aquaculture afin de limiter la transmission hydrique des quelques virus entériques et des bactéries infectieuses (*Entérobacteriaceae*). Afin de réduire la charge bactérienne des eaux polluées, Zhang *et al.* (2010) ont suggéré l'utilisation d'éponge marine du genre *Hymeniacion* *perlevis* comme moyen de Bioremediation.

L'eau prélevée de la ferme aquacole Fat-Steppes était de mauvaise qualité chimique. Les taux respectifs d'ammoniac (NH_3) et de nitrites sont très élevés (11,01 et 4,92 mg/l respectivement). Ces valeurs élevées témoignent de la stagnation de l'eau chargée de matières organiques issues des résidus alimentaires et des fèces dans les étangs à circuit ouverts. Les désordres physico-chimiques de l'eau peuvent affecter la croissance, l'état de santé et le bien-être des tilapias (Elnady *et al.*, 2010 ; Casillas-Hernández *et al.*, 2012).

Amal & Zamri-Saad (2011) ont rapporté que des températures d'eaux supérieure à 27°C , de faibles concentrations en oxygène dissous et des concentrations élevées d'ammoniac non ionisé (NH_3) prédisposent les tilapias aux pathologies bactériennes en particulier celles dues aux streptocoque (*Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus iniae*). Il est connu que la mauvaise qualité des eaux d'élevage provoque un stress chez les poissons et conduit à l'hypersécrétion de la cortisone, qui est une hormone immunosupresseur (El-Shafai *et al.*,

DISCUSSION

2004). L'exposition du poisson à l'ammoniac non ionisée induit à la réduction du tissu lymphoïde rénal (Smith & Piper, 1975) et peut être la cause d'immunodéficience. El-Shebly & Gad (2011) recommandent un seuil de 0,1 mg/l pour la concentration des eaux d'élevage en ammoniac, au-delà duquel, les tilapias (*O. niloticus*) présentent des difficultés respiratoires, une nage aléatoire, une peau terne et des hémorragies au niveau des branchies. De même, l'exposition du poisson à des taux réduits d'oxygène dissous et à des valeurs élevées de nitrates le stresse, le prédispose aux pathologies infectieuses et augmente le taux de mortalité au sein des élevages (El-Shafai *et al.*, 2004).

La qualité microbiologique de l'aliment de tilapia formulé à *AQUABIOR* est meilleure par rapport à celui réalisé à Fat-Steppe. Cette différence est certainement due à l'influence du mode de stockage et à la contamination croisée via les manipulateurs. L'aliment fabriqué à Fat-Steppes contenait une charge de flore mésophile totale et de moisissures à la limite des critères microbiologiques de la norme algérienne (NA 6115) (3×10^6 ufc/g et 10^3 ufc/g respectivement) et des anaérobies sulfite-réducteur en excès ($> 10^2$ ufc/g). Ces derniers témoignent d'une contamination des bactéries sporulées telluriques. En effet, au niveau de cette ferme aquacole le séchage de l'aliment fabriqué se fait par épandage sur le sol du local de stockage et à température ambiante. Nyong & Olubunmi (2014) ont rapporté que les facteurs environnementaux tels que l'humidité, l'humidité relative, la température, la lumière et l'oxygène affectent la qualité nutritionnelle et hygiénique de l'aliment. Des niveaux élevés d'humidité et de température favorisent la croissance des microorganismes (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) (Zmyslowska & Lewandowska, 1999 ; Nwabueze & Nwabueze, 2011). Les niveaux d'hygiène du procédé technologique utilisé lors de la formulation des aliments détermineront le niveau de risque de la contamination microbienne soutenue par la température (Lim *et al.*, 2008). De ce fait, le respect de certaines bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et de fabrication (BPF) est primordial afin de minimiser les risques microbiologiques pour les poissons. Awe & Amijobi, (2011) proposent le recours aux automates pour formuler l'aliment industriel afin de limiter le contact des manipulateurs et indirectement de mieux contrôler la contamination croisée par des staphylocoques dorés et par les coliformes.

De plus, l'aliment mal conservé est incriminé dans la contamination des eaux d'élevages par les coliformes (Mandal *et al.*, 2009).

Le taux de moisissures dans l'aliment de Fat-Steppes bien qu'inférieur à la norme algérienne (NA 6115), témoigne des mauvaises conditions de conservation (température et humidité

DISCUSSION

relative élevées). Les champignons du genre *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* produisent des mycotoxines redoutables pour le poisson et le consommateur (Caruso *et al.*, 2013). Les plus communes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone et les trichothécènes. Leurs effets toxicologiques chez les poissons dépendent du type de mycotoxine et de la relation dose-exposition à laquelle les poissons sont soumis (Pettersson, 2012). Les intoxications se manifestent par un ralentissement de croissance, l'altération de l'état général et atteintes d'organes spécifiques impliquant notamment le foie. Une incidence élevée des tumeurs hépatiques est enregistrée à cause des aflatoxines (AFSSA, 2006 ; Brown, 2009 ; Caruso *et al.*, 2013).

5. Evolution temporelle de la qualité du tilapia conservé à 30°C et à 4°C :

5.1. Qualité sensorielle

Le poisson est une denrée alimentaire rapidement périssable. Il subit immédiatement après sa mort un processus naturel de décomposition qui est le résultat de la superposition de réactions chimiques, enzymatiques et bactériennes (Aubourg, 2005). Cette détérioration engendre une perte rapide des propriétés organoleptiques, une réduction de la valeur nutritive et la formation de substances toxiques (Ozogul *et al.*, 2011). Les changements sensoriels du poisson sont perçus par les sens humains (vue, odorat, goût et toucher). Les premières modifications sensorielles du poisson pendant le stockage concernent l'apparence et la texture. L'odeur et la flaveur évoluent ultérieurement (Adolphe, 2006).

Dans la présente étude, la limite du rejet organoleptique du tilapia (*O. niloticus*) est de 12 heures à température ambiante et de 5 jours à température de réfrigération. Des résultats similaires ont été obtenus par Adoga *et al.* (2010) pour du tilapia entier stocké à température ambiante (30°C). Du tilapia rouge (*Oreochromis sp.*) a été jugé acceptable pendant 15 heures d'entreposage à 28°C ± 2°C (Bakar & Izzah, 1995). Les mêmes délais (5 jours) ont été accordés pour le rejet du merlu (*Merluccius merluccius*) (Pastoriza *et al.*, 2008) conservé à 4°C. Oucif *et al.* (2012) ont montré que seulement trois jours sont nécessaires pour le rejet du maquereau de l'Atlantique (*Scomber scombrus*) conservé à 4°C. Par ailleurs, un délai d'une semaine en moyenne est accordé pour la réfrigération de différentes espèces de poissons (Ozogul *et al.*, 2005 ; Rezaei & Hosseini, 2008 ; Tuckey *et al.*, 2012).

5.2. Qualité microbiologique

Le muscle du poisson vivant est stérile. Néanmoins, une charge bactérienne assez importante est présente sur la surface de la peau, sur les branchies et dans le tractus digestif.

DISCUSSION

Après la mort, le système immunitaire du poisson s'effondre permettant la prolifération bactérienne et l'invasion de la chair du poisson pendant le stockage (Gram & Huss, 1996). La prolifération est favorisée par la valeur du pH qui est proche de la neutralité (supérieur à 6,0) (Ozogul *et al.*, 2005). La nature chimique et structurale particulières de la chair du poisson le rend plus susceptible à la croissance bactérienne (Huss, 1995). De plus, l'importance de la fraction azotée non protéique (ANP) représente un important substrat pour la croissance bactérienne (Gram & Dalgaard, 2002). Dans le présent travail, la qualité microbiologique du tilapia conservé à 4°C et 30°C a été évaluée par la croissance temporelle de la flore anaérobie totale (FMAT) et les entérobactéries (ENT). Un critère microbiologique de sécurité alimentaire est fixé par l'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) à 6,0 log ufc g⁻¹ afin de déterminer les délais microbiologiques de conservation des produits de la pêche frais. La durée de conservation du tilapia (*O. niloticus*) a été ainsi limitée à 12 h et à 5 jours pour les conservations respectives à 30°C et à 4°C où la FMAT et les ENT ont dépassé le seuil microbiologique critique (6,0 log ufc g⁻¹). Cette étude confirme que la détérioration microbiologique du poisson est affectée par le mode de stockage (Huss, 1995) et qu'il existe un rapport linéaire entre la charge de bactéries d'altérations et la température du stockage. La réfrigération ralentit l'activité microbienne par rapport au stockage à température ambiante. Des résultats similaires ont été obtenus par Adoga *et al.* (2010) au sujet de la charge microbienne en FMAT chez le tilapia du Nil entreposé à température ambiante (30°C). Concernant les échantillons réfrigérés, les résultats étaient conformes aux données de la littérature obtenues par Zhou *et al.* (2011) en décrivant la conservation de l'obscur entier (*Takifugu obscurus*) et celles de Mexis *et al.* (2009) qui ont travaillé sur des filets de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Un délai de 7 jours a été accordé pour la réfrigération du merlu (*Merluccius merluccius*) (Pastoriza *et al.*, 2008) et le lingcod (*Ophiodon elongates*) (Duan *et al.*, 2010).

Afin de réduire la charge microbienne du tractus digestif, responsable de l'altération *post mortem* du poisson, il est préconisé d'éviscérer le poisson (Kose, 2010). Huss (1995), a rapporté que le système digestif du poisson renferme de nombreuses bactéries productrices d'enzymes digestives durant les périodes d'alimentation. Ces enzymes sont capables de créer une autolyse prononcée *post mortem* qui peut produire une saveur désagréable dans la région abdominale ou même causer l'éclatement du ventre. De ce fait, la mise à jeun des poissons entre un jour à 03 jours (en fonction de la température) avant leur écoulement, permettrait de réduire la quantité des fèces dans l'intestin, de retarder l'altération bactérienne et de réduire l'activité enzymatique digestive (Borderias & Sanchez-Alonso, 2011).

DISCUSSION

5.3. Qualité biochimique

a. *pH* :

Lors de l'analyse de l'altération biochimique, nous avons démontré que le pH du tilapia diminue légèrement puis reste statistiquement inchangé tout au long des périodes de conservations étudiées (ambiante et réfrigéré). Ceci peut s'expliquer par l'accumulation de composés basiques dans la chair du tilapia qui sont issus des réactions autolytiques ou à partir des métabolismes bactériens (Tokur *et al.*, 2004). Ozogul *et al.* (2006) a rapporté que le pH *post mortem* du poisson variait entre 6,0 à 7,1 en fonction de la saison, de l'espèce, et d'autres facteurs. De plus, le fait que la chair du poisson ne contient qu'une infime proportion de glycogène, son degré d'acidification *post mortem* est très limité en comparaison aux viandes bovines où le pH peut atteindre 5,5 (Jezek & Buchova, 2012).

b. *Oxydation lipidique* :

Le suivi de l'oxydation des lipides est un outil indispensable dans l'évaluation de la qualité du poisson (Melton, 1983). Cependant, les produits de l'oxydation des lipides interagissent rapidement avec d'autres constituants qui ne sont pas sensibles au dosage (Aubourg *et al.*, 2007). Nous remarquons que la formation des diènes est initiée à l'état frais du tilapia. En effet, ces composés sont formés au cours des premières étapes de l'oxydation des lipides (Weber *et al.*, 2008). D'ailleurs, nous avons constaté que le pic de l'indice diène est atteint au bout de 6 heures puis il régresse rapidement dans les deux modes de conservation étudiés (ambiant et réfrigéré). Il a été démontré que les diènes conjugués se forment rapidement jusqu'à un certain pourcentage puis ils s'impliquent dans des réactions oxydatives additionnelle induisant leur extinction (Shahidi *et al.*, 1994 ; Wanasundara *et al.*, 1995 ; White, 1995). Les diènes conjugués issus de l'oxydation des acides gras polyinsaturés à longues chaînes présentent des structures complexes pouvant interférer sur les mesures d'absorbance (White, 1995 ; Aubourg *et al.*, 1998 ; Dobarganes & Velasco, 2002). La pertinence du dosage des diènes conjugués est souvent interrogée, on considère que ce paramètre sert de mesure relative de l'oxydation lipidique (Pegg, 2001 ; Eymard, 2003). Des résultats similaires ont été démontrés par Sae-leaw *et al.* (2013) lorsqu'ils ont évalué l'oxydation lipidique de la peau de tilapia (*O. niloticus*) conservé sous glace (0°C).

La cinétique de formation des hydroperoxydes dépend du contenu lipidique. Les espèces à taux lipidique élevé, présentent une augmentation de la concentration en hydroperoxydes (Undeland *et al.*, 1999). Les résultats enregistrés lors de notre étude montrent la présence d'hydroperoxydes sur les échantillons frais. En effet, dès la mort de l'animal, la baisse du pH

DISCUSSION

due à la glycolyse représente des conditions favorables pour initier la peroxydation lipidique. Quel que soit le mode de conservation, le même schéma évolutif de production d'hydroperoxydes est observé avec un décalage dans le temps en faveur de la réfrigération. En effet, le froid n'inhibe pas mais ralentit cette production (Rodriguez *et al.*, 2008). L'augmentation de la teneur en hydroperoxydes persiste jusqu'au deuxième jour à 4°C et 24 heures à 30°C puis décline rapidement. Ceci peut être expliqué par la phase de propagation classique du processus de peroxydation (Azhar & Nisa, 2006). Des résultats identiques ont été démontrés par Oucif *et al.* (2012) au deuxième jour de stockage du maquereau Atlantique (*Scombrus scombrus*) à 4°C et à 30°C et en utilisant la même méthode analytique que la notre. Chez le tilapia, la phase de propagation est relativement courte en raison du pH post mortem proche de la neutralité, favorisant la présence des formes actives de myoglobines (puissant catalyseur de lipoperoxydation pH dépendante) (Baron & Anderson, 2002) et des ions métalliques.

La cinétique des TBARS est inversement proportionnelle à la cinétique des hydroperoxydes (Alghazeer *et al.*, 2008). Nous constatons, qu'en parallèle, les TBARS restent plus au moins stables au début de la conservation. Ensuite, leurs concentrations croissent rapidement et restent statistiquement inchangés jusqu'à la fin de l'expérience pour les deux modes de conservation étudiés. La teneur et la rapidité de la formation des TBARS dépendent du contenu en phospholipides du poisson. Ces substances sont le substrat de formation des hydroperoxydes, eux-mêmes précurseurs de la formation des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (Ke *et al.*, 1977). La perte des antioxydants naturels durant la période de conservation pourrait contribuer à l'augmentation de l'oxydation (Sampels, 2013). Une valeur seuil de 1 mg MDA kg⁻¹ est habituellement fixée et acceptée pour évaluer la peroxydation des viandes rouges (Rahardjo & Sofos, 1993). Chez les poissons, les valeurs seuils varient en fonction des espèces étudiées. Dans le cadre de notre travail, nous avons arbitrairement recommandé une valeur seuil de 0,85 mg MDA kg⁻¹ pour la conservation à température ambiante (30°C). Cette dernière est atteinte au bout de 12 heures d'entreposage correspondant au moment du rejet organoleptique. Les TBARS peuvent être de bons indicateurs de fraîcheur du tilapia pour les deux modes de stockage. Nos résultats corroborent les résultats précédemment réalisés sur du tilapia du Nil (*O. niloticus*) par Bakar & Izzah (1995), Adoga *et al.* (2010) et Yarnpakdee *et al.* (2012). Aubourget *et al.* (2001, 2005) ont montré que l'étude des hydroperoxydes, des TBARS ainsi que l'analyse sensorielle constituent une combinaison pertinente pour l'évaluation de la qualité du poisson et la formation d'odeur de rance liée majoritairement aux TBARS.

DISCUSSION

c. Protéolyse bactérienne et enzymatique :

Lors de l'évaluation de la protéolyse, nous avons démontré que l'évolution temporelle des concentrations d'ABVT et du TMA est linéaire indépendamment du mode de stockage. Elles sont insignifiantes dans le tilapia frais puis elles évoluent indéfiniment. L'augmentation des concentrations d'ABVT s'explique par l'accumulation de ces constituants majeurs (NH_3 , DMA et TMA) dans le tilapia altéré. L'ammoniaque (NH_3) est générée à partir de la déamination bactérienne des acides aminés aussi bien qu'à partir de l'autolyse de l'adénosine monophosphate (AMP) (Shakila *et al.*, 2003). Le diméthylamine (DMA), bon indicateur d'entreposage en congélation, est généré par l'autolyse bactérienne ou par la déméthylation enzymatique du TMAO (oxyde de triméthylamine) en DMA et en formaldéhyde (Barett, 1985). Des limites critiques de 30-35 mg ABVT-N 100 g⁻¹ et de 10-15 mg TMA-N 100 g⁻¹ de chair du poisson ont été établis pour différentes espèces de poisson respectivement par le règlement européen CE/2074/2004 et par Connel (1995). La tendance de la production du TMA pendant la conservation dépend de la croissance des bactéries d'altérations. Ces dernières se servent de la TMAO comme substrat en conditions d'anaérobiose et le réduisent en TMA induisant des odeurs désagréables chez le poisson (Seibel & Walsh, 2002). A température ambiante, nos résultats, sont en concordance avec ceux d'Aina *et al.* (2010) et Farag (2012) pour la valeur du TMA-N et à ceux d'Adoga *et al.* (2010), Farag (2012) et Karami *et al.* (2012) pour les valeurs d'ABVT-N chez des espèces de tilapia sp. Les valeurs seuils d'ABVT et du TMA-N sont dépassées au bout de 12 heures à 30°C. La conservation réfrigérée prolonge ces délais jusqu'à 5 jours en moyenne avant de dépasser les seuils critiques établis. Des résultats similaires ont été rapportés par Marrone *et al.* (2009) et Baixas-Nogueras *et al.* (2007) sur du merlu (*Merluccius merluccius*). Les résultats obtenus corroborent les résultats de l'analyse sensorielle et microbiologique où la durée de conservation du tilapia (*O. niloticus*) se limitait à 12 heures à 30°C et à 5 jours à 4°C. Une forte corrélation a été révélée par le test de Pearson ($Rho > 0,82$) entre les résultats de l'ABVT et du TMA avec ceux de l'analyse microbiologique, sensorielle et des TBARS.

Dans le cadre de ce travail une nouvelle méthode HPTLC (High performance thin layer chromatography) a été développée pour le screening et la quantification des amines biogènes. Après plusieurs tests préliminaires sur le choix de la phase stationnaire ? (feuille de silice basique pour une CCM ou gel de silice greffé), le choix de la phase mobile, la méthode d'extraction et de dansylation ?, nous avons opté pour la combinaison de techniques existantes. Une première a servi pour l'extraction des amines biogènes à partir de la chair de tilapia selon

DISCUSSION

la technique décrite par Lapa-Guimaraes & Pickova (2004) suivie d'une seconde méthode pour la dansylation décrite par Jia *et al.* 2012.

Les performances de la nouvelle méthode HPTLC développée sont satisfaisantes en termes de linéarité ($R^2 > 0,98$), fidélité (répétabilité et reproductibilité), exactitude et justesse selon les recommandations de la décision européenne 2002/657/CE. La séparation des six amines d'intérêt par HPTLC à une dimension est parfaite sur une phase stationnaire (plaque HPTLC–Silica gel G60) et en utilisant la phase mobile (chloroforme / diéthyle éther / triéthylamine (4 / 1 / 1 ; v/v/v). La résolution des spots révélés est de haute qualité, et les rapports frontaux (Rf) des six amines sont distincts. C'est une technique relativement simple et rapide (2 heures 30 de manipulation en moyenne).

Les techniques chromatographiques CCM ou HPTLC ont évolué rapidement dans le temps et toutes leurs composantes ont été améliorées (matériel et protocoles). Afin d'optimiser le rendement d'extraction différentes solutions et divers solvants ont été testés par les scientifiques. L'extraction des amines biogènes à partir des matrices alimentaires par une solution de TCA à 5 % semble donner un meilleur pourcentage (98 %) du rendement d'extraction (Luten *et al.*, 1992 ; Shalila *et al.*, 2001). Du méthanol à 100 % (Bajc & Gacnik, 2009), du méthanol à 80 % (Tao *et al.*, 2011), une solution d'acide perchlorique à 0,2 M (Duflos, 2009), ou à 5 % (Rodrigues *et al.*, 2013) et une solution d'HCl 0,1 N (Jia *et al.*, 2011) ont également été appliqués.

Shakyla *et al.* (2001) a démontré l'efficacité du chlorure de dansyle dans la dérivation des amines biogènes en dérivés chromophores qui sont facilement visible sous UV en raison des caractéristiques de fluorescence. Le chlorure de benzoyle peut aussi être choisi pour la dérivation des amines biogènes (Bakar *et al.*, 2010 ; Kulawik *et al.*, 2013). Divers protocoles ont été développés pour la technique de dérivations des amines. Shalaby (1995) a proposé une technique de dansylation à température ambiante pendant un minimum de 10 heures de temps afin de dériver 8 amines biogènes extraites à partir de fromage, du hareng fumée et des saucisses. Le même auteur en 1999, a pu améliorer sa technique de base en raccourcissant le temps de réaction de la dansylation par le biais d'un chauffage dans un incubateur à 40°C pendant une heure de temps. Shakila *et al.* (2001) a testé la même réaction de dansylation dans un incubateur chauffé à 55 pendant 1 heure. Plus récemment, les auteurs ont proposés une réaction de dansylation dans un bain-marie dont le chauffage et le temps de réaction varient considérablement.

L'amélioration de la phase mobile a suscité l'intérêt des scientifiques afin de permettre une meilleure séparation des amines biogènes, que ce soit avec une CCM à une ou double

DISCUSSION

dimension. Une panoplie de combinaisons entre les différents solvants a été proposée. Au fur et à mesure quelques solvants ont été écartés et substitués en raison de leurs toxicités. Shalaby (1995) a décrit un double système de solvants pour le développement de 8 amines biogènes par CCM à une dimension : chloroforme : benzène : triéthylamine (6 : 4 : 1 ; v / v/ v) et benzène : acétone : triéthylamine (10 : 2 : 1 ; v / v/ v). Shakila *et al.* (2001) et Shakila & Vasundhara, (2002) ont utilisé une phase mobile constituée de chloroforme et triéthylamine (100 : 25 ; v / v). Valls *et al.* (2002) ont comparé différentes phases mobiles et ils ont démontré que le mélange acétone / ammoniac (95 : 5 ; v / v) donnait une meilleure séparation et résolution. Bajc & Gacnik. (2009) ont repris la même phase mobile (acétone / ammoniac, 95 : 5 ; v / v) pour séparer l’histamine à partir de poissons et des produits de la pêche. Lapa-Guimaraes & Pickova (2004) ont également comparé différentes combinaisons de solvants appliquées en un seul système de développement ou en double système. Ces auteurs ont démontré que le mélange chloroforme : diéyle éther : triéthylamine (4 : 1 : 1 ; v / v/ v) s’avère le plus efficace pour la séparation de 10 amines biogènes à partir du poisson et du calamar. Lattore-Moratalla *et al.* (2009) ont retesté la même phase mobile des précédents auteurs pour identifier et quantifier des amines biogènes produites par des bactéries isolées à partir de saucisses. Tao *et al.* (2011) ont analysé la présence de l’histamine dans du poisson et des produits de la pêche par CCM en utilisant le mélange de solvant ammoniac : éthanol (1 : 3 ; v/v). Ayesh *et al.* (2012) ont rapporté l’efficacité du mélange chloroforme / benzène / triéthylamine (6 : 4,5 : 1 ; v / v/ v).

Pour la quantification des amines biogènes révélées dans des spots sur la plaque CCM ou HPTLC, deux techniques sont habituellement utilisées pour traduire l’intensité des spots en chromatogrammes. La première consiste à scanner la plaque dans un densitomètre de type CAMAG TLC (Bajc & Gacnik, 2009) ou de type Shimadzu (Shakila *et al.*, 2001 ; Lapa-Guimaraes & Pickova, 2004). La seconde technique sollicite des logiciels d’imagerie du genre Lane & Spot analyser (Tao *et al.*, 2011).

Contrairement aux poissons d’eaux de mers, peu d’études ont été réalisées sur l’évolution temporelle des amines biogènes chez les poissons d’eaux douces. Notre étude a démontré que chez le tilapia du Nil conservé au réfrigérateur (+4°C), uniquement la tyramine, la spermidine et la spermine sont exprimés tout le long des cinq jours de conservation. Ces amines sont considérés comme des amines naturelles du muscle des poissons dû aux facteurs physiologiques ou environnementaux (Veciana-Nogues *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2010). La cadavérine, la putrescine et l’histamine sont indétectable du fait quelle soient inférieurs au seuil de détection de la méthode (5 µg/g). Des résultats similaires ont été obtenus

DISCUSSION

par Kulawik *et al.* (2013) qui ont montré que les concentrations de l'histamine, de la cadavérine et de la putrescine avaient du mal à dépasser 6 µg/g après 21 jours de conservation sous glace (0°). De même, ces trois dernières amines étaient inférieures à 10 µg/g durant 9 jours de conservation dans le filet du tilapia (*O. niloticus*) à 0°C (Liu *et al.*, 2010). Les mêmes résultats sont rapportés par Sil *et al.* (2008) sur la conservation du tilapia (*O. mossambicus*) sous glace où les concentrations de la cadavérine, putrescine et histamine se limitait à un maximum de 1,5 µg/g.

En ce qui concerne l'entreposage du tilapia à température ambiante (30°C), nous avons démontré que les taux de la putrescine et de la cadavérine dépassent le seuil des 100 µg/g à partir de la 18^{ème} heure de conservation. Cette évolution est fortement corrélée avec l'évolution sensorielle (Figure 38) ainsi qu'avec les cinétiques de la croissance bactérienne de la flore mésophile totale et des entérobactéries, qui dépassent le seuil des 6 log ufc/get dont l'activité aminogène s'active. De plus le profil en acides aminés du tilapia qui est relativement riche en arginine et en lysine par rapport à l'histidine, favorise forcément la production de putrescine et de cadavérine. La putrescine et la cadavérine sont considérés comme de bons indicateurs de qualité durant l'entreposage à température ambiante. Nos résultats divergent par rapport à ceux obtenus par Sil *et al.* (2008) qui ont estimé que le tilapia (*O. mossambicus*) entreposé à 28°C produisait un maximum de 2,5 µg/g d'histamine au bout de 18 heures. De plus, les concentrations de la putrescine et de la cadavérine étaient trop faibles ne dépassant pas le seuil d'1 µg/g. Par ailleurs, nos résultats concordent bien avec ceux obtenus pour différentes espèces de poissons d'eaux douces. En effet, Krizek *et al.* (2002, 2004) ont étudié le changement des amines biogènes dans les filets de carpe (*Cyprinus carpio*) conservés à 3°C et à 15°C. Ils ont démontré que la putrescine est le meilleur indicateur de qualité chez cette espèce. Les cinétiques de la putrescine et de la cadavérine sont fortement corrélés avec l'évolution sensorielle. De ce fait, des indices d'amines biogènes (BAI) alternatifs ont été proposés pour correspondre à une qualité organoleptique acceptable de la chair de la carpe selon les formules suivantes : Put + Cad = 20 - 45, Put = 10 - 20 ou Cad = 10 - 25. Les mêmes auteurs (Krizek *et al.*, 2011) en étudiant la perche (*Perca fluviatilis*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans les mêmes conditions de conservation, ont confirmé la fiabilité de la putrescine comme étant un bon indice de qualité. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) conservée 12 jours dans la glace (0°), Chytiri *et al.* (2004), Rezaei *et al.* (2007) et Rodrigues *et al.* (2013) ont montré qu'une concentration en putrescine estimée à 13 - 14 µg/g était un indicateur d'une qualité acceptable. Kordiovaska *et al.* (2006) ont évalué la dynamique des amines biogènes chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) conservée à 4°C, 24°C et à -18°C. Uniquement la

DISCUSSION

putrescine, la spermidine et la spermine ont été détectés chez la carpe fraîchement pêchée. Leurs concentrations respectives étaient trop faibles et de l'ordre de 0,3 µg/g, 1,3 µg/g et 3,7 µg/g mg/kg. A 4°C et au bout de 7 jours de conservations les concentrations en putrescine, en cadavérine, en spermidine, et en tyramine étaient inférieures à 10 µg/g. L'histamine n'a pas été décelée et la concentration en spermine était de l'ordre de 26 µg/g. A 25°C et au bout de 48 heures de conservation, les concentrations en cadavérine et en histamine étaient remarquablement élevées (> 200 µg/g). La concentration en putrescine avoisinait les 100 µg/g et celles en spermidine, en spermine et en tyramine étaient assez faibles (< 30 µg/g).

Shi *et al.* (2012, 2014) ont révélé que la putrescine est un bon indicateur de qualité des filets de carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*) conservés à 0°C, 3°C et 15°C. Ils ont aussi montré que la dynamique de cette amine biogène était fortement corrélée avec l'évolution du taux d'ABVT, du taux de la flore aérobie totale et de la qualité sensorielle. A 15°C et après 3 jours de conservation, les concentrations en histamine, en cadavérine et en putrescine se trouvaient respectivement aux alentours de 27 à 55 µg/g. Celles en spermidine et en spermine étaient proches des 10 µg/g et la concentration en tyramine était de l'ordre de 20 µg/g. A 3°C et au bout de 6 jours de conservation les concentrations en putrescine et en cadavérine étaient inférieures au seuil des 10 µg/g. La concentration en histamine dépassait les 20 µg/g et celles en spermidine, en spermine et en tyramine étaient moyennes (± 15 µg/g). Les concentrations en amines biogènes chez le tilapia sont nettement plus importantes en fonction de la température. Nos résultats corroborent l'impact positif des basses températures sur la concentration en amines biogènes. Le froid limite la charge des bactéries aminogènes et prolonge indirectement la date d'utilisation optimale du poisson.

CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

La stratégie analytique élaborée pour l'analyse des résidus d'acide oxolinique chez le tilapia est très pertinente. Les caractéristiques de performances des deux méthodes sont acceptables pour l'analyse de l'acide oxolinique dans la chair de poisson. En pratique, ces deux méthodes seront facilement transposables sur d'autres matrices moins complexes que le poisson. Le screening microbiologique sera efficace pour le contrôle qualitatif en Algérie des produits de la pêche et des produits aquacoles et il peut être un outil d'autocontrôle de routine instauré dans les systèmes de gestion de qualité (HACCP). D'autres investigations seront projetées pour développer cette technique et plusieurs souches bactériennes seront optimisées. Quant à l'analyse chromatographique LC-UV, elle servira de base pour la quantification des résidus des fluoroquinolones dans les denrées alimentaires d'origine animale et le protocole sera optimisé pour développer d'autres méthodes de confirmation pour d'autres familles d'antibiotiques.

Notre étude a renforcé l'opinion scientifique au sujet de l'emploi inoffensif de la 17α -MT pour la masculinisation des juvéniles de tilapia. La MT ne représente aucun risque environnemental ou humain lorsqu'on applique de bonnes pratiques d'élevage pour la tilapiculture. Le traitement hormonal (28 jours) doit être limité seulement au stade précoce des alevins qui est estimé à 10 jours post-éclosion. La dose thérapeutique ne doit pas dépasser les 65 mg kg^{-1} d'aliment. Pour assurer la salubrité des poissons écoulés dans les marchés locaux, la période de grossissement requise est d'un minimum de 5 mois. Les ouvriers des fermes de tilapia doivent prendre en considération les dangers chimiques émanant de la poudre de l'hormone MT et doivent se conformer aux instructions de son stockage et de son utilisation. Des systèmes mécanique et biologique doivent être prévus dans les fermes aquacoles afin de filtrer les eaux rejetées à partir des écloserie.

Il est impératif de construire des bassins et des étangs d'élevage selon des normes zootechniques. La fabrication et le stockage des aliments d'élevage requièrent une certaine technicité et un savoir faire. L'élevage intensif ou semi-intensif des tilapias se déroulent de préférences aux seins de circuits fermés dotés d'un système de filtration mécanique et biologique.

Sur le plan nutritionnel, le tilapia est un poisson très intéressant pour son profil protéique et peut facilement substituer le régime alimentaire humain basé sur les viandes rouges. Il peut aussi satisfaire le consommateur en acides aminés essentiels et être proposé pour un régime minceur pauvre en graisse. Néanmoins, la perception du consommateur algérien vis-à-vis un poisson d'eaux douces est très timide. Un aspect culinaire plus moderne doit être intégré dans les habitudes alimentaires algériennes.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

L'analyse conjointe des paramètres organoleptiques, microbiens et biochimiques est une stratégie pertinente pour la détermination de la date limite de consommation des poissons. Une analyse sensorielle objective associée à l'ABVT, TMA, TBARS, FMAT & ENT ainsi que les amines biogènes (putrescine et cadavérine en particulier) sont de bons indicateurs de la qualité du tilapia conservé à 4°C et à 30°C dont les DLC respectives recommandées aux consommateurs se limitent respectivement à 5 j et 12 heures. La combinaison de l'analyse des hydroperoxydes et des TBARS semble être une bonne stratégie analytique qui reflète la cinétique en temps réel du mécanisme d'oxydation lipidique par l'apparition successive des produits primaires et secondaires. L'évaluation de la protéolyse peut être simplement reflétée par l'analyse d'ABVT et du TMA et consolidée par la recherche des amines biogènes. La méthode HPTLC développée dans le cadre de notre recherche peut être proposée pour les contrôles de routines des amines biogènes par les services vétérinaires ou les laboratoires spécialisés. Le screening de plusieurs échantillons à la fois est possible par cette nouvelle méthode. Par contre l'identification et la quantification précise des concentrations d'amines biogènes doit se faire par HPLC qui est la méthode de référence. Dans cette optique une méthode LC-UV et UPLC-UV sont en cours de validation, respectivement, au sein du laboratoire *AQUABIOR* et LADA.

La réfrigération exerce un effet protecteur sur la qualité du poisson et prolonge les délais de sa conservation. La congélation est connue d'être encore plus efficace d'où la nécessité d'imposer l'entreposage des poissons sous glace.

Nos résultats peuvent servir de base scientifique pour la législation et les services d'inspection vétérinaire pour mieux réguler les ventes de poissons dans les marchés locaux.

Le consommateur doit être sensibilisé sur l'importance du respect de la chaîne de froid pour cette denrée alimentaire fragile et doit impérativement respecter les DLC afin de prévenir quelque intoxication alimentaire.

En tant que solution globale et interactive, la mise en œuvre du système HACCP est souhaitable dans les fermes aquacoles. Le modèle élaboré dans ce travail est spécifique au tilapia élevé en eau douce. Il peut garantir la salubrité du poisson produit à Fat-Steppes (Ouest d'Algérie). D'autres dangers peuvent être pris en considération pour compléter cette étude. L'aspect parasitaire (les métacercaires de Trématodes), l'impact des polluants persistants (dioxines, HAP, PCB et métaux lourds) et la présence d'éventuels pesticides seront envisageables à l'avenir. De même que l'impact des farines végétales issues de plantes transgéniques (utilisation des organismes génétiquement modifiés "OGM") sur la qualité de la chair du poisson et sur la santé publique.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Les risques chimiques liés aux résidus médicamenteux ou aux métaux lourds sont plus redoutables que le risque microbiologique liées aux pathogènes ou aux bactéries indicatrices. Les dangers microbiologiques sont souvent maîtrisés par la cuisson tandis que les dangers chimiques sont connus pour leurs effets cumulatifs dans le poisson. Pour cela, il est temps que la législation algérienne et les autorités compétentes mettent l'accent sur ce genre de risques alimentaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abucay J.S. & Mair G.C., 1997. Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquaculture Research*, **28**: 841-845.

Abucay J.S., Mair G.C., Skibinski D.O.F. & Beardmore J.A., 1997. The occurrence of incidental sex reversal in *Oreochromis niloticus* L. In: K. Fitzsimmons (Editor), Proceedings from the Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service (NRAES), Cooperative Extension, Ithaca, New York, pp. 729-738.

Ackman R.G. 1994. Seafood lipids. In Seafoods chemistry, processing technology and quality. Shahidi F. & Botta J.R. (Eds.). *Blackie Academic & professional*, New York, 34-48.

Adoga I.J., Joseph E. & Samuel O.F., 2010. Storage life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in ice and ambient temperature. *Researcher*, **2**(5): 39-44.

Adolphe Y., 2006. Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de flores du poisson. Thèse de Doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut National Polytechnique de Lorraine, 132p.

AFNOR., 1994. Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie. pp 59.

AFSCA., 2011. Guide d'autocontrôle pour le secteur du poisson G-032. pp 532.

Aina V.O., Hauwa H.M.S. & Zakari A., 2010. Comparative determination of trimethylamine in fresh fish (halibut, mudfish and tilapia). *Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science*, **4**: 44-46.

Alanasier C., 1996. Evolution post mortem des lipides musculaires et des activités lipolytiques chez le lapin. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I. 165 p.

AlBulushi I., Poole S., Deeth H.C. & Dykes G.A., 2009. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**(4): 369-377.

Alghazeer R., Saeed S. & Howell N.K., 2008. Aldehyde formation in frozen mackerel (*Scomber scombrus*) in the presence and absence of instant green tea. *Food Chemistry*, **108**(3), 801-810.

Al-Harbi A.H. & Uddin N., 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, **250**(3-4): 566-572.

Al-Harbi A.H., 2011. Molecular characterization of *Streptococcus iniae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, **312**: 15-18.

Al-kahtani H.A., Abu-Tarboush H.M., Atia M., Bajaber A.S., Ahmed M.A. & El- Mojaddidi M.A., 1998. Amino acid and protein changes in tilapia and spanish mackerel after irradiation and storage. *Radiation Physics and Chemistry*, **51**(1): 107-114.

Al-Sayed M.K., 2007. Extraction, fractionnement et caractérisation des lipides polyinsaturés d'œufs de la truite arc-en-ciel (*oncorhynchus mykiss*). Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Lorraine. 157p.

Amal M.N.A. & Zamri-Saad M., 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, **34**(2): 195-206.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aman C.S., Pastor A., Cighetti.G. & De La Guardia M., 2006.** Development of a multianalyte method for the determination of anabolic hormones in bovine urine by isotope-dilution GC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**: 1869-1879.
- Anderson A. K., 2008.** Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets. *Food Chemistry*, **107**(2): 761-767.
- Anh P.T., Kroeze C., Bush S.R. & Mol A.P.J., 2010.** Water pollution by Pangasius production in the Mekong Delta, Vietnam: causes and options for control. *Aquaculture Research*, **42**(1), 108-128.
- AOAC., 2002.** Official Method 977.13. Histamine in seafood - Fluorometric method. "Official Methods of Analysis of AOAC International", II (35), 17-19
- Archibault P., Ambroggi G. & Nicolas S. 1988.** Oxolinic acid in trout: bioavailability and tissue residues. *Annales de Recherches Vétérinaires*, **19**: 39-23.
- Armstrong S.M., Hargrave B.T. & Haya K., 2005.** Antibiotic use in finfish aquaculture: modes of action, environmental fate, and microbial resistance. *The handbook of environmental chemistry*, **5**: 341-357.
- Aro T., Brede C., Manninen P. & Kallio H., 2002.** Determination of semivolatile compounds in Baltic herring (*clupea harengus membras*) by Supercritical Fluid Extraction - Supercritical Fluid Chromatography - Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 1970-1975.
- Arvanitoyannis I.S. & Varzakas T.H., 2009.** Application of ISO 22000 and comparison with HACCP on industrial processing of common octopus (*Octopus vulgaris*) - Part I. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**: 58-78.
- Asad F., Ahmed I., Saleem M. & Iqbal T., 2010.** Hormonal masculinization and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by androgen administration at different dietary protein levels. *International Journal of Agriculture and Biology*, **6**(12): 939-943.
- Ashwin H., Stead S., Caldow M., Sharman M., Stark J., De Rijk A. & Keely B.J., 2009.** A rapid microbial inhibition-based screening strategy for fluoroquinolone and quinolone residues in foods of animal origin. *Analytica Chimica Acta*, **637**: 241–246.
- Ataguba G.A., Kamble M.T., Omeji S., Azpeitia T., Chavan B.R. & Medhe S.V., 2014.** Potency of herbal extracts for the treatment of streptococcus infection in tilapia. *International Journal of Basis and Applied Biology*, **2**(3): 137-142.
- Aubourg S., Medina I. & Gallardo J. 1998.** Quality assessment of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) during chilled storage by monitoring lipid damages. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3662-3666.
- Aubourg S., 2001.** Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **78**: 857-862.
- Aubourg S.P., Rodriguez A. & Gallardo J.M., 2004.** Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): effect of catching season and commercial presentation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**: 316-323.
- Aubourg S, Pineiro C., Gallardo J.M. & Barros-Velazquez J., 2005.** Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, **90**: 445-452

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aubourg S., Quitral V., Larrain A., Rodriguez A., Gomez J., Maier L. & Vinagre J., 2007. Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chemistry*, **104**: 369-375.

Aursand M., Bleivik B., Rainuzzo J.R., Jorgensen L. & Mohr V., 1994. Lipid distribution and composition of commercially farmed Atlantic salmon (*salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **64**: 239-248.

Austin B., Rayment J. & Alderman D.J., 1983. Control of furunculosis by oxolinic acid. *Aquaculture*, **31**: 101-108.

Awe S. & Ajimobi I.K., 2011. Microbiological quality of fish pellet. *Bioresearch Bulletin*, **4**: 245-249.

Ayesh A.M., Ibraheim M.N., El-Hakim A.E. & Mostafa E.A.H. 2012. Exploring the contamination level by biogenic amines in fish samples collected from markets in Thuel – Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*, **6**(6): 1158-1164.

Azaza M.S., Dhraief M.N., Kraiem M.M. & Baras, E., 2010. Influences of food particle size on growth, size heterogeneity, food intake and gastric evacuation in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L., 1758. *Aquaculture*, **309**: 193-202.

Azhar K.F. & Nisa K., 2006. Lipids and their oxidation in seafood. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **28**(3): 298-305.

-B-

Bacot S., 2004. Caractérisation d'un nouvel aldéhyde plaquettaire (4- Hydroxydodecadienal) et formation d'adduits de Mickael avec les phospholipides à l'éthanolamine. Thèse de doctorat. Université De Lyon. p187.

Bagumire A., Todd E.C.D., Nasinyama G.W., Muyanja C., Rumbeiha K.W., Harris C. & Bourquin L.D., 2009. Potential sources of food hazards in emerging aquaculture industry in sub-Saharan Africa: Case study for Uganda. *International Journal of Food Science and Technology*, **9**: 1677-1687.

Baiano J.C.F. & Barnes A.C., 2009. Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerging Infectious Diseases*, **15**(12): 1891-1896.

Bailac S., Barron D. & Barbosa., 2006. New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, **580**: 163-169.

Baixas-Nogueras S., Bover-Cid S., Veciana-Nogués M.T. & Vidal-Carou M.C., 2007. Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing. *European Food Research and Technology*, **226**: 287-293.

Baixas-Nogueras S., Bover-Cid S., Veciana-Nogués T., Nunes M.L. & Vidal-Carou M.C., 2003. Development of a Quality Index Method to evaluate freshness in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Science*, **68**(3): 1067-1071.

Baje Z. & Gacnik K.S., 2009. Densitometric TLC Analysis of Histamine in Fish and Fishery Products. *Journal of Planar Chromatography*, **22**(1): 15-17.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bakar J. & Izzah A.N., 1995.** Sensory, biochemical and microbiological changes of farmed catfish (*Clarias batrachus*, Linnaeus) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) at ambient storage. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, **18**(3): 215–220.
- Bakar J., Yassoralipour A., Bakar F.A. & Rahman, R.A., 2010.** Biogenic amine changes in barramundi (*Lates calcarifer*) slices stored at 0°C and 4°C. *Food Chemistry*, **119**(2): 467-470.
- Bamba Y., Ouattara A., Da Costa K.S. & Gourène G., 2008.** Production d'*Oreochromis niloticus* avec des aliments à base de sousproduits agricoles. *Sciences & Nature*, **5**(1): 89-99.
- Baras E. & Melard, C., 1997.** Individual growth patterns of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): emergence and dynamics of sexual growth dimorphism. In: Fitzsimmons, K. (Ed.), Tilapia Aquaculture. *North-East Reg. Agricultural Engineering Services*, **106**: 169-177.
- Baras E., Jacobs B. & Melard C., 2001.** Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed XX–XY/progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, **192**: 187-199.
- Barg U.C., 1995.** Lignes directrices pour la promotion de la gestion de l'environnement dans le développement de l'aquaculture côtière (Etude fondée sur l'examen d'expériences et de concepts choisis). FAO Document technique sur les pêches. N° **328**. Rome, FAO. 133p.
- Barker. G.A., 1994.** Detection of 4-quinolone residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) muscle using a bio-assay. *Aquaculture*, **127**: 83-90.
- Baroiller J.F. & Clota F., 1998.** Interactions between temperature effects and genotype on *Oreochromis niloticus* sex determination. *Journal of Experimental Zoology*, **281**, 506-528.
- Baroiller J.F., D'Cotta H., Bezault E., Wessels S. & Hoerstgen-Schwark G., 2009.** Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **153**: 30-38.
- Baron C.P. & Andersen H.J., 2002.** Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 3887-3897.
- Barrett E.L., 1985.** Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annual Review of Microbiology*, **39**: 131-149.
- Barry T. P., Marwah A. & Marwah P., 2007.** Stability of 17 α -methyltestosterone in fish feed. *Aquaculture*, **271**: 523-529.
- Beardmore J.A., Mair G.C. & Lewis R.I., 2001.** Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, **197**: 283-301.
- Beaudouin E., Renaudin J.M., Sergeant P., Morisset M., Moneret-Vautrin D.A. & Kanny G., 2009.** Les principaux diagnostics différentiels en allergie alimentaire. *Revue Française d'Allergologie*, **49**(3): 291-295.
- Belal F., Al-Majed A.A. & Al-Obaid A.M., 1990.** Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. *Talanta*, **50**: 765-786.
- Bendiksen E.A. & Jobling M., 2003.** Effects of temperature and feed composition on essential fatty acid (n-3 and n-6) retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, **29**:133-140.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bezault E., Clota F., Derivaz M., Chevassus B. & Baroiller J-F. 2007.** Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, **272**: 3-16.
- Bhandari R.K., Nakamura M., Kobayashi T. & Nagahama Y., 2006.** Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, **145**(1): 20-24.
- Bhasin S., Bagatell C.J., Bremner W. J., Plymate S.R., Tenover J.L., Korenman S.G. & Nielschlag E., 1998.** Issues in testosterone replacement in old men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**: 3435-3448.
- Bjorklund H. & Bylund G., 1991.** Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, **21**: 1511-1520.
- Bjorklund H., Eriksson A. & Bylund G., 1992.** Temperature-related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **102**: 17-27.
- Blaszczyk A., Augustyniak A. & Skolimowski J., 2013.** Ethoxyquin: an antioxidant used in animal feed. *International Journal of Food Science*, **2013**: 1-12.
- Blazquez M. & Somoza G.M., 2010.** Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, **166**: 470-477.
- Blumenthal U.J., Duncan Mara D., Peasey A., Ruiz-Palacios G. & Stott R., 2000.** Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bulletin of the World Health Organization*, **78**(9): 1104-1116.
- Boari C.A., Pereira G.I., Valeriano C., Silva B.C., De Moraes V.M., Figueiredo H.C.P. & Piccoli R.H., 2008.** Bacterial ecology of tilapia fresh fillets and some factors that can influence their microbial quality. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **28**(4): 863-867.
- Bonilla A.A., 2004.** Development of a Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and consumer acceptance of different cod products. Final Project of UNU Fisheries Training Programme. pp. 54.
- Borderias A.J. & Sanchez-Alonso I., 2011.** First processing steps and the quality of wild and farmed fish. *Journal of Food Science*, **76**(1): 1-5.
- Bosma R.H & Verdegem C.J., 2011.** Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. *Livestock Science*, **139**: 58-68.
- Bostoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos V.N., Mantis A.J. & Trakatellis A.G., 1994.** Rapid sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**: 1931-1937.
- Bover-Cid S. & Holzapfel W.H., 1999.** Improve screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **53**: 33-4.
- Bourre J-M., 2005.** Acides gras ω -3 et troubles psychiatriques. *Médecine / sciences*, **21**(2): 216-221.
- Bovee T.F.H. & Pikkemaat M.G., 2009.** Bioactivity-based screening of antibiotics and hormones. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 8035-8050.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bremner H.A., 1985. A convenient easy-to-use system for estimating the quality of chilled seafood. In: DN, Scott, and C Summers, Eds. Proceedings of the Fish Processing Conference, Nelson, New Zealand, 23-25 April 1985. Fish Proceeding Bulletin 7, pp. 59-703.

Bremner H.A., 2002. Safety and Quality issues in Fish processing. Wood head Publishing limited.

Brown D.I., 2009. Aflatoxins: occurrence and health risk. In: Plant poisonous to livestock. *Publication of department of Animal science, Cornell University.*

Buedge J.A. & Aust S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In Biomembranes (Part C: Biological Oxidation), Methods in Enzymology, Fleisher S.F. & Packer L. (Eds.) London Academic Press; Vol.52: 302-309.

Bush S.R., Khiem N.T. & Sinh L. X., 2009. Governing the environmental and social dimensions of pangasius production in Vietnam: a review. *Aquaculture Economics & Management*, **13**: 271-293.

Bush S.R. & Duijf M., 2011. Searching for (un)sustainability in pangasius aquaculture: A political economy of quality in European retail. *Geoforum*, **42**: 185-196.

- C -

Cahu C., Zambonino I.J.L. & Takeuchi T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, **227**: 245-58.

Calder P.C., Ahluwalia N., Brouns F., Buetler T., Clement K., Cunningham K., Esposito K., Jonsson L.S., Kolb H., Lansink M., Marcos A., Margioris A., Matusheski N., Nordmann H., O'Brien J., Pugliese G., Rizkalla S., Schalkwijk C., Tuomilehto J., Warnberg J., Watzl B. & Winklhofer-Roob B.M., 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, **106**: 1-78.

Carbonera N., Cappelletti B.M. & Espirito Santo M.L.P., 2011. ISO 22000/HACCP associated with the presence of microorganisms in the processing of tilapia (*Oreochromis niloticus*) filets. *Quality Assurance Journal*, **14**: 50-60.

Caruso D., Talamond P. & Moreau Y., 2013. Mycotoxines et pisciculture : un risque oublié ? *Cahiers Agricoles*, **22**(8): 165-173.

Casillas-Hernández R., Silva Ontiveros C.A., Camacho Estrada M.A., Ibarra-Gómez J.C. & Lares-Villa F. 2012. Water quality and nutrient budget in experimental closed tilapia *Oreochromis niloticus* culture systems. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, **8**(2): 46-55.

Celik I., Guner Y. & Celik P., 2011. Effect of orally-administrated 17 α -Methyltestosterone at different doses on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10**(7): 853-857.

Chafer-Pericas C., Maquieira A., Puchades R., Miralles J. & Moreno A., 2011. Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control*, **22**: 993-999.

Chakraborty S.B., Mazumdar D., Chatterji U. & Banerjee S. 2011. Growth of mixed-sex and monosex Nile tilapia in different culture systems. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **11**: 133-140.

Chapman A., 2003. Culture of hybrid tilapia: reference profile. *IFAS extension. University of Florida. Edt*, 86 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chéret R., 2005.** Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. Thèse de Doctorat. École Polytechnique. Université de Nantes, 172 p.
- Choi J., Yee A.J. Thompson D., Samoluk J. & Mitchell M., 1999.** Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues using *Escherichia Coli* as indicator organism. *Journal of AOAC International*, **82**(6), 1407-1412.
- Choi J., Mamun M.I.R., El-Aty A.M., Park J., Shin E., Park J.Y., Cho S., Shin S.C., Lee K.B. & Shim J., 2011.** Development of a single-step precipitation cleanup method for the determination of enrofloxacin, ciprofloxacin, and danofloxacin in porcine plasma. *Food Chemistry*, **127**: 1878-1883.
- Christodoulou E.A., Samanidou V.F. & Papadoyannis., 2007.** Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *Journal of Chromatography B*, **859**: 246-255.
- Chu P-S., Lopez M., Serfling S., Giesecker, C.E. & Reimschuessel R., 2006.** Determination of 17 α -methyltestosterone in muscle tissues of tilapia, rainbow trout, and salmon using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**: 3193-3198.
- Chytiri S., Chouliara I., Savvaidis I.N. & Kontominas M.G., 2004.** Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology*, **21**: 157-165.
- Cillard J. & Cillard P., 2006.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **13**(1): 24-29.
- Codex Alimentarius., 1997.** Supplément au volume 1B. Conditions générales exigées (hygiène des aliments), 2^{ème} éd., Rome, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture/ Organisation mondiale de la Santé.
- Codex Alimentarius 2003.** Code d'usages international recommandé -principes généraux d'hygiène alimentaire. **CAC/RCP 1-1969**, RÉV. 4. pp. 19.
- Codex Alimentarius, 2004.** Code d'usages pour une bonne alimentation animale. **CAC/RCP 54-2004**. pp. 28.
- Codex Alimentarius, 2005.** Code d'usages visant à réduire au minimum et à maîtriser la résistance aux antimicrobiens. **CAC/RCP 61-2005**. pp. 16.
- Codex Alimentarius, 2012a.** Code d'usages pour les poissons et les produits de la pêche. **CAC/RCP 52-2003**, 2^{ème} édition. pp. 271.
- Codex Alimentarius, 2012b.** Limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. Mises à jour à la trente-cinquième session de la Commission du Codex Alimentarius. **CAC/LMR 2-2012**. pp. 39.
- Cole D.W., Cole R., Gaydos S.J., Gray J., Hyland G., Jacques M.L., Powell-Dunford N., Sawhney C. & Au W.W., 2009.** Aquaculture: environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **212**: 369-377.
- Connell J.J., 1995.** Control of fish quality (4th ed.). London: Fishing News Books Limited.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Connor W. E., 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Society for Clinical Nutrition*, **71**(1):171-175.

Contreras-Sanchez W.M., Fitzpatrick M.S. & Schreck C.B., 2001. Fate of methyltestosterone in the pond environment: detection of MT in pond soil from a crsp site. In: A. Gupta, K. McElwee, D. Burke, J. Burrigh, X. Cummings, and H. Egna (Editors), Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 79-82.

Contreras-Sanchez, W.M., 2010. Bacteria on steroids: A new way to make water at tilapia farms safer? [en ligne] Adresse URL: <http://aquafishcrsp.oregonstate.edu/video/?video=1>, consulté le 15/12/2011.

Cooper K.M., McCracken R.J. & Kennedy D.G., 2005. Nitrofurazone accumulates in avian eyes - a replacement for semicarbazide as a marker of abuse. *Analyst*, **130**, 824-827.

Corongiu F.P. & Banni S., 1994. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, **233**: 303-313.

Corraze G. & Kaushik S.J., 1999. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **6**(1): 111-115.

Coyne R., Samuelsen O.B., Kongshaug H., Andersen K., Dalsgaard I., Smith P. & Bergh O. A., 2004. Comparison of oxolinic acid concentrations in farmed and laboratory held rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following oral therapy. *Aquaculture*, **239**: 1-13.

Coyne R., Bergh O., Smith P. & Samuelsen O.B., 2005. A question of temperature related differences in plasma oxolinic acid concentrations achieved in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under laboratory conditions following multiple oral dosing. *Aquaculture*, **245**: 13-17.

Cravedi J.P., Choubert G. & Delous G., 1987. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*, **60**: 133-141.

Cravedi J.P., Delous G., Debrauwer L. & Prome D., 1993. Biotransformation and branchial excretion of 17 α -methyltestosterone in trout. *Drug Metabolism and Disposition*, **2**(21): 377-385.

CRL., 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Guidance Paper of 20th January 2010, 1-20.

-D-

Dabrowski K., Rodriguez G., Lee K-J., Abiado M.A.G., Contreras-Sanchez W.M., Marquez-Couturier G. & Phelps R.P., 2004. Studies on fate of methyltestosterone and its metabolites in tilapia and on the use of phytochemicals as an alternative method to produce a monosex population of tilapia. In: R. Harris, I. Courter, & H. Egna (Editors), Twenty-First Annual Technical Report. Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 53-60.

Dalgaard P., 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, **26**: 319-333.

Dalgaard P., 2000. Freshness, Quality and Safety in Seafoods. Technical Report for EU-FLAIR FLOW Dissemination Project (F-FE 380A/00 – May 2000), Lyngby, Denmark, 16p.

Dang P.K., 2007. Adaptation d'une méthode microbiologique pour détecter des résidus d'antibiotiques dans les crevettes du Vietnam. Mémoire de DES. Université de Liège, 39p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dang P.K., Degand G., Danyi S., Pierret G., Delahaut P., Ton V.D., Maghuin-Rogister G. & Scippo M.L., 2010.** Validation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in shrimp tissue. *Analytica Chimica Acta*, **672**: 30-39.
- Dang P.K., Degand G., Douny C., Ton V.D., Maghuin-Rogister G. & Scippo M.L., 2011.** Optimisation of a new two-plate screening method for the detection of an antibiotic residues in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**(10): 2070-2076.
- Daniel P., 2009.** Available chemotherapy in Mediterranean fish farming: Use and needs. In: The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. *Options Méditerranéennes* : Mont-de-Marsan, **86**:197-205.
- Danyi S., Widart J., Douny C., Dang P.K., Baiwir D., Wang N., Tu H.T., Tung V.T., Phuong N.-T., Kestemont P. & Scippo M.-L., 2011.** Determination and kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) using a liquid chromatography/mass spectrometry method. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **34**(2): 142-152.
- Dauda A.B., Yakubu S.O. & Oke A.O., 2014.** Curbing the menace of prolific breeding in "aquatic chicken" (tilapia): a way out to improve fish production in Nigeria. *New York Science Journal*, **7**(4): 112-118.
- De Brabander H. F., Noppe H., Verheyden K., Vanden Bussche J., Wille K., Okerman L., Vanhaecke L., Reybroeck W., Ooghe S. & Croubels S., 2009.** Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, **1216**(46): 7964-7976.
- De La Torre C.A.L. & Conte-Junior C.A., 2013.** Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **50**(6): 430-446.
- Délépée R., 2003.** Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole. Thèse de Doctorat. Université de Nantes, 244 p.
- Delhalle L., Daube G., Adolphe Y., Crevecoeur S. & Clinquart A., 2012.** Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **16**(3): 369-381.
- Derat-Carrière., 2007.** Manger du poisson : repères diététiques et culinaires. *Phytothérapie*, 46-50.
- De Souza N.E., Matsushita M., De Oliveira C.C., Franco M.R.B. & Visentainer J.V., 2007.** Manipulation of fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets with flaxseed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**: 1677-1681.
- Desprez D. & Mélard C., 1998.** Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, **162**: 79-84.
- Devlin R.H. & Nagahama Y., 2002.** Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, **208**: 191-364.
- Dhanapal K., Reddy G.V.S., Naik B.B., Venkateswarlu G., Reddy A.D. & Basu S., 2012.** Effect of cooking on physical, biochemical, bacteriological characteristics and fatty acid profile of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) fish steaks. *Archives of Applied Science Research*, **4**(2): 1142-1149.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dobarganes M.C. & Velasco J., 2002. Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**(7): 420-428.

Doi A.M., Stoskopf M.K. & Lewbart G.A., 1998. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the red pac (*Colossoma brachypomum*) following different routes of administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**: 364-368.

Donoghue D.J. & Schneider M.J., 2003. Comparison between a bioassay and liquid chromatography- fluorescence-mass spectrometry for the determination of incurred enrofloxacin in whole eggs. *Journal Of AOAC International*, **86**(4): 669-674.

Doyle M.P. & Ericson M.C., 2006. Closing the door on the faecal coliform assay. *Microbe*, **1**: 162-163.

Duan J., Cherian G. & Zhao Y., 2010. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chemistry*, **119**: 524-532.

Duflos G., 2009. Le Risque Histamine Dans Les Produits De La Pêche. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **162**(3): 241-246.

Dumay J., 2006. Extraction des lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: Application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). Thèse de doctorat. Université de Nantes. 318 pp.

- E -

EC., 1995. 1442/95, 1995, of 26 June 1995 amending Annexes I, II, III and IV to Regulation (EEC) N° 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food stuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, **L143**, 26-30.

EC., 2002. Décision 2002/657/CE de la commission, du 12 Aout 2002, portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, **L221**. pp. 36.

Edris A.M., Amany M.S. & Michael A.F., 2014. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh tilapia nilotica fish. *Benha Veterinary Medical Journal*, **26**(1): 120-126.

EFSA., 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, **9**(10): 1-93.

Elagba H.A.M. & Al-Sabahi G.N., 2011. Fatty acids content and profile of common commercial Nile fishes in Sudan. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, **3**(6): 99-104.

El Barbri N., Amari A., Vinaixa M., Bouchikhi B., Correig X. & Llobet E., 2007. Building of a metal oxide gas sensor-based electronic nose to assess the freshness of sardines under cold storage. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **128**(1): 235-244.

Elnady M.A., Alkobaby A.I., Salem M.A., Abdel-Salam M. & Asran B.M. 2010. Effect of fertilization and low quality feed on water quality dynamics and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of American Science*, **6**(10): 1044-1054.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El-Sayed A-F.M., 2006.** Tilapia Culture. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 277 pp.
- El-Shafai S.A., Gijzen H.J., Nasr F.A. & El-Gohary F.A., 2004.** Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. *Environmental Research*, **95**: 231-238.
- El-Shebly A.A. & Gad H-A.M., 2011.** Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Microbiological and Biotechnology Research*, **1**(4):183-197.
- EMA., 2005.** Veterinary medicines and inspections. Committee for medicinal products for veterinary use, Oxolinic acid.[en ligne] (sans date) Adresse URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_Report/2009/11/WC500015359.pdf. Consulté le 10/03/ 2011.
- Emire S.A. & Gebremariam M.M., 2009.** Influence of frozen period on the proximate composition and microbiological quality of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, **34**: 743-757.
- Endo T., Ogishima K., Hayasaka H., Kaneko S. & Ohshima S., 1973.** Oxolinic Acid. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*, **39**:165-171.
- Endo T. & Onozawa M., 1987a.** Bioavailability of ultrafine preparation of oxolinic acid in red sea breams. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**(8): 557-562.
- Endo T. & Onozawa M., 1987b.** Effects of pH and temperature on the uptake of oxolinic acid by goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**(8), 551-555.
- Enick O.V. & Moore M.M., 2007.** Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment. *Environmental Impact Assessment Review*, **27**: 707-729.
- Eurin J., Tamtam F., Ollivon D., Tiphagne-Larcher K. & Chevreuril M., 2005.** Les antibiotiques dans les eaux de surface du bassin de la Seine : évaluation de la contamination dans différents milieux. Rapport d'activité. Programme scientifique *PIREN Seine*, 9p.
- EU., 1996a.** Directive 96/23/CE du Conseil, du 29 Avril 1996, relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE. *Journal officiel de la Communauté Européenne*, **L125**. pp. 32.
- EU., 1996b.** Règlement (CE) n° 2406/96 du conseil du 26 novembre 1996 fixant des normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **L 334**. pp. 15.
- EU., 1998.** Directive 98/64/CE de la Commission du 3 septembre 1998 portant fixation des méthodes d'analyse communautaires pour la détermination des acides aminés, des matières grasses brutes et de l'olaquinox dans les aliments des animaux et modifiant la directive 71/393/CEE. *Journal officielle de l'union européenne*, **L 257**: p. 14-28.
- EU., 2000.** Directive 2000/45/CE de la Commission du 6 juillet 2000 établissant des méthodes communautaires d'analyse pour la détermination de la vitamine A, de la vitamine E et du tryptophane dans les aliments pour animaux. *Journal officiel de l'union européenne*, **L 174** : p. 32-50.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

EU., 2003. Directive 2003/74/EC of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. Vol. Directive 2003/74/EC (Parliament E., ed), pp17-21. *Official Journal of the European Union*, L **262**. pp.5.

EU., 2005a. Règlement (CE) n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005, concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel de l'union européenne*, L **338**. pp. 22.

EU., 2005b. Règlement (CE) N° 2074/2005 de la commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n° 853/2004 et (CE) n° 854/2004. *Journal officie de l'union européenne*, L **338**. pp 33.

EU., 2010. Règlement N° 37/2010 de la commission, du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. *Journal officiel de la communauté européenne*, L**15**. pp.72.

Evans J.J., Klesius P.H., Pasnik D.J. & Bohnsack J.F., 2009. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Diseases*, **15**(5): 774-776.

Eymard S., 2003. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*): choix des procédés. Thèse de doctorat. Université de Nantes. 143 p.

Eymard S. & Genot C., 2003. A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**: 497-501.

Eymard S., Carcouet E., Rochet M.-J., Dumay J., Chopin C. & Genot C., 2005. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**: 1750–1756.

- F -

Fagerlund U H.M. & Dye H.M., 1979. Depletion of radioactivity from yearling coho salmon (*oncorhynchus kisutch*) after extended ingestion of anabolically effective doses of 17 α -methyltestosterone-1, 2-³ H. *Aquaculture*, **18**: 303-315.

FAO., 1989. ADCP/REP/89/46 - Les Méthodes de Production d'Alevins de Tilapia Nilotica. [En ligne] (Sans date) Adresse URL : <http://www.fao.org/docrep/t8655f/t8655f00.htm#Contents>, consulté le 15/ 05/ 2010.

FAO., 1999a. Problèmes de salubrité posés par les produits de l'aquaculture. [En ligne] (Sans date) Adresse URL: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42237?locale=fr>, consulté le 10/ 04/2014.

FAO., 1999b. FAO Fisheries Report. No. 604. Report of the FAO Expert Consultation on the Trade impact of Listeria in Fish Products.FAO Fish Utilization and Marketing Service; FAO Food Quality and Standard Service.Amherst, MA, USA, 34 p. [En ligne] (Sans date) Adresse URL :<http://www.fao.org/fi/publ/report/r604/r604e.asp>, consulté le 10/ 12/2014.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- FAO., 2004.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. [En ligne] (Sans date) Adresse URL : <http://www.fao.org/docrep/007/y5600f/y5600f00.htm>, consulté le 10/ 03/2011.
- FAO/OIE/WHO, 2006.** Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Joint Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Seoul, Republic of Korea, 13-16 June 2006.
- FAO., 2010.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. [En ligne] (Sans date) Adresse URL: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820f/i1820f00.htm>, consulté le 10/ 03/2011.
- FAO., 2012.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. [En ligne] (Sans date) Adresse URL: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727f/i2727f00.htm>, consulté le 10/ 11/2012.
- FAO., 2014.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. [En ligne] (Sans date) Adresse URL: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/fr/c/232704/>, consulté le 13/ 08/2014.
- Farag H.E.M., 2012.** Sensory and chemical changes associated with microbial flora of *Oreochromis niloticus* stored in ice. *International Food Research Journal*, **19**(2): 447-453.
- Farmer, E.H. & Sutton, D.A. 1946.** Peroxidation in relation to olefinic structure. *Transactions of the Faraday Society*, **42**:228-232.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Acta Chimica*, **56**: 108-115.
- Feng J.B., Jia X.P. & Li L.D., 2008.** Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28°C. *Aquaculture*, **276**: 29-35.
- Fitzpatrick M.S., Contreras-Sánchez W.M. & Schreck C.B., 2000.** Methyltestosterone persists in the environment after use formasculinizing Nile tilapia. In: B. Hart and B. Brown (Co-Chairs), Book of Abstracts, Aquaculture America 2000. World Aquaculture Society, New Orleans, Louisiana, p. 112.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G.H., 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipides rom animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, **226** (1): 497-509.
- Fontagné -Dicharry, S. & Médale, F., 2010.** Les lipides des poissons d'aquaculture et leurs facteurs de variation. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, **17**, 209-213.
- Fox B.K., Tamaru C.S., Hollyer James., Castro L.F, Fonseca J.M., Jay-Russell M. & Low T., 2012.** A preliminary study of microbial water quality related to food safety in recirculating aquaponic fish and vegetable production systems. *Food Safety and Technology*, **51**: 1-11.
- Frankel E.N., 1998.** Lipid oxidation. *The Oily Press. (vol. 10)*. Dundee, Scotland. 10, 130.
- Fuentes-Silva C., Soto-Zarazua G.M., Torres-Pacheco I. & Flores-Range A., 2003.** Male tilapia production techniques: A mini-review. *African Journal of Biotechnology*, **12**(36): 5496-5502.

-G-

Gandini G., Ababouch L. & Anichini L., 2009. From eco-sustainability to risk assessment of aquaculture products. *Veterinary Research Communications*, **33**(1): 3-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Garces A., Zerzanova A., Kucera R., Barron D. & Barbosa J., 2006.** Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric studies Application to pharmacokinetics studies. *Journal of Chromatography A*, **1137**: 22-29.
- Garcia-Villar N., Hernandez-Cassou S. & Saurina J., 2009.** Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1216**: 6387-6393.
- Garrett E.S., Jahncke M.L. & Martin R.E., 2000.** Applications of HACCP principles to address food safety and other issues in aquaculture. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **9**(1): 5-20.
- Gatti Junior P., Assunção A. W.A., Baldin J.C. & Amaral L.A., 2014.** Microbiological quality of whole and filleted shelf-tilapia. *Aquaculture*, **433**: 196-200.
- Gaudin V. & Sanders P., 2005.** Guide for analytical validation of screening methods. Draft document, version 2, 19/10/2005. Internal document of laboratoire d'études et de recherches sur les Médicaments Vétérinaires et les Désinfectant- AFSSA Fougères, France.
- Genot C., 1996.** Some factors influencing TBA test. Report of diet-ox project (AIRIII-CT-92-1577).
- German J.B., Chen S.E. & Kinsella J.E., 1985.** Lipid oxidation in fish tissue. Enzymic initiation via lipoxigenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**(4): 680-683.
- Giuffrida A., 2003.** Application of risk management to the production chain of intensively reared fish. *Veterinary Research Communications*, **27**(1): 491-496.
- Gomez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Caldach-Giner, J.A., Medale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J. & Perez-Sanchez, J., 2003.** Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **220**: 749-767.
- Gomez C., Pozo O. J., Marcos J., Segura J. & Ventura R., 2013.** Alternative long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. *Steroids*, **78**, 44-52.
- Gonzales Jr J.M. & Brown P.B., 2006.** Nile tilapia *Oreochromis niloticus* as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. *Advances in Space Research*, **38**: 1132-1137.
- Goudie C.A., Shelton W.L. & Parker N.C., 1986.** Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated Blue tilapia. *Aquaculture*, **58**: 215-226.
- Gram L., Wedell-Neergaard C. & Huss H.H., 1990.** The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, **10**(3-4): 303-316.
- Gram, L. & Huss, H.H., 1996.** Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: 121-137.
- Gram L. & Melchiorson J., 1996.** Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, **80**: 589-595.
- Gram, L. & Dalgaard, P., 2002.** Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**(3): 262-266.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Green B.W. & D.R. Teichert-Coddington., 1994. Growth of Control and Androgen-treated Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), during Treatment, Nursery and Grow-out Phases in Tropical Fishponds. *Aquaculture and Fisheries Management*, **25**: 613-621.

Green B.W. & D.R. Teichert-Coddington., 2000. Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17-a-Methyltestosterone to Produce Male Tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, **31**: 337- 357.

Guerrero R.D.III., 1975. Use of androgens for production of all male *Tilapia aurea* (Steindachner). *Transactions of the American Fisheries Society*, **2**:342-347.

Guerrero R.D.III., 2008. Tilapia Sex Reversal. [en ligne] Adresse URL: <http://www.agribusinessweek.com/tilapia-sex-reversal/>, consulté le 12/ 05/ 2012.

Guesnet P., Alessandri J-M., Vancassel S., Denis I. & Lavialle M., 2005. Acides gras oméga 3 et fonctions cérébrales. *Nutrition clinique et métabolisme*, **19**: 131-134.

Guichard B., 2000. Devenir d'un aliment médicamenteux dans le tractus digestif du turbot (*Psettamaxima*, L. 1758), pour l'étude des rejets d'un antibactérien en pisciculture marine. Thèse de Doctorat. Université de Nantes, 2000, 100 p.

-H-

Haard N.F., 1992. Biochemistry and chemistry color changes in seafoods. In: *Advances in Seafood Biochemistry*. Eds. Flick, G.J. & Martin, R.E. Technomic Publishing Co. Lancaster, 305-360.

Haenen O.L.M., Evans J.J. & Berthe F., 2013. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Scientific and Technical Review of the International Office of Epizootics*, **32**(2): 497-507.

Hasheesh W.S., Marie M-A. S., Abbas H.H., Eshak M.G. & Zahran, E.A., 2011. An Evaluation of the Effect of 17 α -Methyltestosterone Hormone on some Biochemical, Molecular and Histological Changes in the Liver of Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Life Science Journal*, **8**(3): 343-358.

Hassan M.N., Rahman M., Hossain M.B., Hossain M.M., Mendes R. & Nowsad A.A.K.M., 2013. Monitoring the presence of chloramphenicol and nitrofurantoin metabolites in cultured prawn, shrimp and feed in the Southwest coastal region of Bangladesh. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, **39**(1): 51-58.

Hastein T., Hjeltnes B., Lillehaug A., Utne Skare J., Berntssen M. & Lundebye A.K.; 2006. Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. *Scientific and Technical Review of the International Office of Epizootics*, **25**(2): 607-625.

Hastein T., 2007. OIE involvement in Aquatic Animal Welfare: the need for development of guidelines based on welfare for farming, transport and slaughter purposes in aquatic animals. In *The OIE Global Conference on Aquatic animal Health* (B. Dodet & Service scientifique et technique de l'OIE, édit.). *Dev. Biol.* (Basel), Karger, **129**, 149-161.

He S., Zhou Z., Liu Z., Cao Y., Meng K., Shi P., Yao B. & Ringo E., 2010. Effects of the antibiotic growth promoters Flavomycin and Florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂). *Archives of Microbiology*, **192**: 985-994.

Hernandez Serrano P., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. N° 469. Rome, FAO. 97p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hernandez M.D., Lopez M.B., Álvarez A., Ferrandini E., García García B., & Garrido M.D., 2009.** Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry*, **114**(1): 237-245.
- Hernandez A., Garcia B.G., Jordan M.J. & Hernandez M.D., 2014.** Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures. *Animal Feed Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.003>.
- Homklin S., Ong S.K., & Limpiyakorn T., 2011.** Biotransformation of 17 α -methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. *Chemosphere*, **82**: 1401-1407.
- Homklin S., Ong S.K., & Limpiyakorn T., 2012.** Degradation of 17 α -methyltestosterone by *Rhodococcus* sp. and *Nocardioides* sp. isolated from a masculinizing pond of Nile tilapia fry. *Journal of Hazardous Materials*, **221- 222**: 35-44.
- Hooper D., 2002.** Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci. *Lancet Infectious Diseases*, **2**(9): 530-538.
- Huang C.H., Hultin H.O., Jafar S.S. & 1993.** Some aspects of Fe²⁺ catalysed oxidation in fish sarcoplasmic reticular lipid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**:1886-1892.
- Hulak M., Paroulek M., Simek P., Kocour M., Gela D., Rodina M. & Linhart O., 2008.** Water polluted by 17 α -methyltestosterone provides successful male sex inversion of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from gynogenetic offspring. *Journal of Applied Ichthyology*, **24**: 707-710.
- Hultin H.O., 1994.** Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Shahidi, F. & Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & Professional, New York, 49-74.
- Hungerford J.M., 2010.** Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, **56**: 231-243.
- Huss, H.H., Jakobsen M. & Liston J., 1992.** Quality Assurance in the fish industry. *Elsevier Science Publishers* B.V.
- Huss, H. 1992.** Development and use of the HACCP concept in fish processing. *International Journal of Food Microbiology*, **15**: 33-44.
- Huss, H.H., 1994.** Assurance of Seafood Quality. *FAO Fisheries Technical paper* No: 334, Roma.
- Huss H.H., 1995.** Qualité et son évolution dans le poisson frais. Laboratoire de technologie Ministères de l'agriculture et des pêches Danemark. In : F.A.O. Document Technique sur les Pêches - 348 FAO. L'Organisation des Nations Unies pour L'Alimentation et L'Agriculture.
- Huss H.H., Reilly A. & Ben Embarek P.K., 2000.** Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, **11**: 149-156.
- Huss H.H., Ababouch L. & Gram L., 2004.** Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 444. Rome, FAO. 230p.
- Hustvedt S.O. & Salte R., 1991.** Distribution and elimination of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) after a single rapid intravascular injection. *Aquaculture*, **92**: 297-303.
- Hustvedt S.O., Salte R. & Vassvic V. 1991.** Bioavailability of oxolinic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from medicated feed. *Aquaculture*, **97**: 305-310.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hustvedt S.O., Salte R. & Vassvic V., 1992. Combatting cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with oxolinic acid case report. *Aquaculture*, **103**: 213-219.

Hwang C.C., Lin C.M., Huang C.Y., Huang Y.L., Kang F.C., Hwang D.F. & Tsai Y.H., 2012. Chemical characterisation, biogenic amines contents, and identification of fish species in cod and escolar steaks, and salted escolar roe products. *Food Control*, **25**: 415-420.

- | -

Ibrahim S.M. & El-Sherif S.A., 2008. Effects of some plant extracts on quality aspects of frozen tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) filets. *Global Veterinaria*, **2**(2): 62- 66.

ICMSF, 1986. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications, (2nd ed., vol. 2, pp. 181–196). University of Toronto Press: Toronto, Canada.

Ishida N., 1990a. Comparison of biliary metabolites of oxolinic acid in seven species of teleosts. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**: 55-59.

Ishida N., 1990b. Metabolites of oxolinic acid in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**: 159.

Ishida N., 1992. Tissue levels of oxolinic acid after oral or intravascular administration freshwater and seawater rainbow trout. *Aquaculture*, **102**: 9-15.

ISO 936., 1998. Meat and meat products-Determination of total ash.International standard, 2nd ed. Available at http://www.iso.org/iso/publication_item.htm?pid=PUB100042.

ISO 937., 1978. Meat and meat products -Determination of nitrogen content –reference method. International standard, 1st ed.

ISO 1442., 1997. Meat and meat products-Determination of moisture content – reference method. International standard, 2nd ed.

ISO 1444., 1996. Meat and meat products -Determination of free fat content. International standard, 2nd ed.

ISO 2917., 1999. Meat and meat products -Measurement of pH-reference method.International standard, 2nd ed.

ISO 4832., 2006. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies. International standard, 3rd édition.

ISO 4833-2., 2013. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Partie 2: Comptage des colonies à 30 degrés C par la technique d'ensemencement en surface. International standard, 3rd ed.

ISO 6222., 1999. Qualité de l'eau - Dénombrement des micro-organismes revivifiables -Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé. International standard, 2nd édition.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ISO 6461-2., 1986. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (clostridia) - Partie 2: Méthode par filtration sur membrane. International standard, 1st édition.

ISO 6579., 2002. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. International standard, 4th ed.

ISO 6888-1., 1999. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 1: Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker. International standard, 1st ed.

ISO 7899-1., 2000. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 1: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour les eaux de surface et résiduares. International standard, 2nd édition.

ISO 7937., 2004. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* - Technique par comptage des colonies. International standard, 3rd ed.

ISO 8199., 2005. Qualité de l'eau - Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture. International standard, 2nd édition.

ISO 8402., 1994. Management de la qualité et assurance de la qualité – Vocabulaire.

ISO 9308-2., 2012. Qualité de l'eau - Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 2: Méthode du nombre le plus probable. International standard, 2nd édition.

ISO 16266., 2006. Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* - Méthode par filtration sur membrane. International standard, 1st édition.

ISO 16649-2. 2001. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* B-glucuronidase positive - Partie 2 : technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-glucuronate.

ISO 21527-1., 2008. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures -Partie 1: Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95. International standard, 1st ed.

ISO 21528-1., 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment. International standard, 1st ed.

ISO 21807., 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Determination of water activity. International standard, 1st ed.

- J -

Jarding S., Windmar L., Paterson R. & Fjallsbak J. P., 2000. Quality issues in commercial processing of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Zimbabwe. In *Tilapia Culture in the 21st Century. Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture*, Rio de Janeiro, Brazil. American Tilapia Association, Charles Town, West Virginia, and ICLARM, Penang, Malaysia (pp. 588-594).

Javier S.M., 2012. Edwardsiellosis, an Emerging Zoonosis of Aquatic Animals. *Immunity & Diseases*, 1(1): 1-5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jezeck F. & Buchtova H., 2007.** Physical and Chemical Changes in Fresh Chilled Muscle Tissue of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Packed in a Modified Atmosphere. *Acta Veterinaria Brno*, **76**(8): 83-92.
- Jezeck F. & Buchova H., 2012.** Shelf-life of freeze-thawed fillets of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* V.) packed under air. *Acta Agriculturae Slovenica*, **3**: 275-279.
- Jia S., Kang Y.P., Park J.H., Lee J. & Kwon S.W., 2011.** Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**(51): 9174-9182.
- Jia S., Kang Y.P., Park J.H., Lee J. & Kwon S.W., 2012.** Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, **132**(3): 1185-1190.
- Joffraud J.J., Leroi F., Roy C. & Berdague J.L., 2001.** Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, **66**:175-184.
- Johnstone R., Macintosh D.J. & Wright R.S., 1983.** Elimination of orally administered 17 α -Methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. *Aquaculture*, **35**: 249-257.
- Jonnalagadda P.R., Sudershan R.V., Raji N.S. & Rao D.R., 2009.** Identification of critical control points in the two selected haccp-certified prawn processing units. *Journal of Food Quality*, **32** (2): 177-189.
- JORADP., 1998.** Arrêté interministériel du 27 mai 1998 relatif aux spécifications microbiologique de certaines denrées alimentaires. *Journal officiel de la république algérienne*, N°**35**. 26pp.
- JORADP., 2006.** Arrêté du 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en histamine dans les produits de la pêche par chromatographie liquide haute performance. *Journal officiel de la république algérienne*, N°**58**. pp. 20.
- JORADP., 2009.** Loi n° 09-03 du 29 Safar 1430 correspondant au 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et la repression des frauds. *Journal officiel de la république algérienne*, N°**15**. pp. 11.
- JORADP., 2010.** Décret exécutif n° 10-90 du 24 Rabie El Aouel 1431 correspondant au 10 mars 2010 complétant le décret exécutif n° 04-82 du 26 Moharram 1425 correspondant au 18 mars 2004 fixant les conditions et modalités d'agrément sanitaire des établissements dont l'activité est liée aux animaux, produits animaux et d'origine animale ainsi que de leur transport. *Journal officiel de la république algérienne*, N°**17**. pp. 18.
- Josephson D.B. & Lindsay R.C., 1986a.** Enzymic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. *Biogeneration of Aromasin ACS Symposium Series*, 317: 201-219.
- Josephson D.B. & Lindsay R.C., 1986b.** Measurement of volatile aroma constituents as a means for following sensory deterioration of fresh fish and fishery products. *Proceedings of an international symposium on quality determinations*.
- Josephson D.B., 1991.** Seafood volatils compounds in food and beverages. Maarse H., Marcel decker Inc: 179-204.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Josupeit H., Lem A. & Lupin H., 2001. Aquaculture products: quality, safety, marketing and trade. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery and J.R. Arthur, eds. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 249-257. NACA, Bangkok and FAO, Rome.

-K-

Kantaria U.D. & Gokani R.H. 2011. Quality and safety of biogenic amines. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **2**(4): 1461-1468.

Karami B., Moradi Y., Motallebi A.A., Hosseini E. & Soltani M., 2013. Effects of frozen storage on fatty acids profile, chemical quality indices and sensory properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Tilapia mosambicus*) fillets. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, **12**(2): 378-388.

Karbiwnyk C.M., Carr L.E., Turnipseed S.B., Andersen W.C. & Miller K.E., 2007. Determination of quinolone residues in shrimp using liquid chromatography with fluorescence detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **596**: 257-263.

Karovicova J. & Kohajdová Z., 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, **59**(1)70-79.

Kaushik S.J., Covès D., Dutto G. & Blanc D., 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **230**: 391-404.

Ke P.J., Ackman R.G., Linke B.A. & Nash D.M., 1977. Differential lipid oxidation in various parts of frozen mackerel. *Journal of Food Technology*, **12**: 37-47.

Kenan E. & Chris G.C., 2005. Fish meal replacement by plant and animal by-products in diets for the Australian short-finned eel, *Anguilla australis australis* (Richardson). *Aquaculture Research*, **36**(5): 445- 454.

Khalil W.K.B., Hasheesh W.S., Marie M-A.S., Abbas H.H. & Zahran E.A., 2011. Assessment the impact of 17 α -methyltestosterone hormone on growth, hormone concentration, molecular and histopathological changes in muscles and testis of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Life Science Journal*, **8**(3): 329-343.

Khamboonruang C., Keawvichit R., Wongworapat K., Suwanrangsi S., Hongpromyart M., Sukhawat K., Tonguthai K. & Lima dos Santos C.A., 1997. Application of hazard analysis critical control point (HACCP) as a possible control measure for *Opisthorchis viverrini* infection in cultured carp (*Puntius gonionotus*). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **28**(1): 65-72.

Klein R.A., 1970. The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochemistry and Biophysic Acta*, **210**: 486-489.

Kolditz C-I., 2008. Déterminisme nutritionnel et génétique de la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel (*oncorhynchus mykiss*) : étude par analyse de l'expression de gènes candidats, du protéome et du transcriptome du foie et du muscle. Thèse de Doctorat. Université Bordeaux 1. 263pp.

Kordiovska P., Vorlova L., Borkovcova I., Karpiskova R., Buchtova H., Svobodova Z., Krizek M. & Vacha F., 2006. The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, **51**(6): 262-270.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Korsrub G.O. & Macneil J.D. 1988. Evaluation of the swab test on promises, the calf antibiotic and sulfa test, and a microbial inhibitor test with standard solutions of 22 antibiotics. *Journal of Food Protection*, **51**: 43-46.

Kose S., 2010. Evaluation of seafood safety health hazards for traditional fish products: preventive measures and monitoring issues. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **10**: 139-160.

Krizek, M., Pavlicek T. & Vacha F., 2002. Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**(9): 1088-1093.

Krizek M., Vacha F., Vorlova L., Lukasova J. & Cupakova S., 2004. Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. *Food Chemistry*, **88**(2):185-191.

Krizek M., Vacha F. & Pelikanova T., 2011. Biogenic amines in carp roe (*Cyprinus carpio*) preserved by four different methods. *Food Chemistry*, **126**(3): 1493-1497.

Kulawik P., Ozogul F & Glew R.H.,2013. Quality properties, fatty acids, and biogenic amines profile of fresh tilapia stored in ice. *Journal of Food Science*, **78**(7): 51063-51068.

Kummerer K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review – Part I. *Chemosphere*, **75**:417-434.

Kyрана V.R., Lougovois V.P. & Valsamis D.S., 1997. Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, **32**(4):339-47.

- L -

Ladero V., Martinez N., Martin M.C., Fernandez M. & Alvarez M.A., 2010. qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, **43**(1): 289-295.

Landete J.M., De Las Rivas B., Marcobal A. & Munoz R., 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, **117**(3): 258-269.

Lapa-Guimaraes, J. & Pickova, J., 2004. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, **1045**(1-2): 223-232.

Lara-Flores M., Aguirre-Guzman G., Balan-Zetina S.B., Sonda-Santos K.Y. & Zapata A.A., 2014. Identification of Mycobacterium Agent Isolated from Tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, **14**: 575-580.

Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Veciana-Nogues T. & Vidal-Carou M.C., 2009. Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. *Journal of Chromatography A*, **1216**(18): 4128-4132.

Lazard J., 1990. L'élevage du tilapia en Afrique. Données techniques sur sa pisciculture en étang. In : Méthodes artisanales d'aquaculture du tilapia en Afrique. C.T.F.T. Départ. du CIRAD. Ed., Nogent-sur-Marne, 82 p.

Lazard J., 2009. La pisciculture des tilapias. *Cahiers Agricultures*, **18**: 174-182.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lecerf J-M., 2007.** Produits de la pêche et acides gras oméga 3. Intérêt en prévention cardiovasculaire. *Phytothérapie*, 14-21.
- Leduc F., 2011.** Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Thèse de Doctorat. Université Lille 1. 182pp.
- Lefèvre F., Cos I. & Bugeon J., 2008.** Déterminisme biologique de la qualité des poissons. Poster 12^{ème} JSMTV.
- Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F. & Cardinal M., 1998.** Study of the microbial ecology of cold smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, **39**:111-121.
- Lim H.A., Ng W.K., Lim S.L. & Ibrahim C.O., 2008.** Contamination of palm kernel meal with *Aspergillus flavus* affects its nutritive value in pelleted feed for Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, **32**(11):895-905.
- Liston J., 1980.** Microbiology in fishery science. Advances in fishery science and technology. J.J. Connell. Farnham, England, Fishing News Books Ltd: 138-157.
- Liu S., Fan W., Zhong S., Ma C., Li P., Zhou K., Peng Z. & Zhu M., 2010.** Quality evaluation of tray-packed tilapia fillets stored at 0°C based on sensory, microbiological, biochemical and physical attributes. *African Journal of Biotechnology*, **9**(5): 692-701.
- Lo W-S., Chen H., Chen C-Y. & Kuo C-H., 2014.** Complete genome sequence of *Vibrio vulnificus* 93u204, a bacterium isolated from diseased tilapia in Taiwan. *Genome Announcements*, **2**(5): 1-2.
- Lu, H., Conneely, G.E, Crowe, M. A., Aherne, M., Pravda, M. & Guilbault, G.G., 2006.** Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine urine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Analytica Chimica Acta*, **570**: 116-123.
- Lu X. W., Dang Z. & Yang C., 2009.** Preliminary investigation of chloramphenicol in fish, water and sediment from freshwater aquaculture pond. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **6**(4): 597-604.
- Lunestad B.T., Samuelsen O.B., Fjelde S. & Ervik A., 1995.** Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture*, **134**: 217-225.
- Lunestad B.T., Nesse L., Lassen J., Svihus B., Nesbakken T., Fossum ., Rosnes J.T., Kruse H. & Yazdankhah S., 2007.** Salmonella in fish feed; occurrence and implications for fish and human health in Norway. *Aquaculture*, **265**: 1-8.
- Lupin H.M., 1999.** Producing to achieve HACCP compliance of fishery and aquaculture products for export. *Food Control*, **10** (4-5): 267-275.
- Lupin H.M., Subasinghe R. & Alderman D., 2003.** Antibiotic residues in aquaculture products. In: *The state of world fisheries and aquaculture 2002*. FAO, Rome, Italy, p. 74-83.
- Lupin H.M., 2009.** Human health aspects of drug and chemical use in aquaculture. In : Rogers C. (ed.), Basurco B. (ed.). *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza : CIHEAM. p. 95-103 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Luten J.B., Bouguet W., Seuren L.A.J., Burggraaf M.M., Rick-wel-Booy G., Durand P., Etienne M., Gouyou J.P., Landrein A., Ritchie A., Lecerg M. & Guinet R., 1992. Biogenic amines in fishery products: standardization methods within EC. In H. H. Huss, M. Jakabsen, & J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 427–439). B.V., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.

–M–

Macedo C.F., Amaral L.A. & Sipaubá-Tavares L.H., 2011. Microbiology quality in continuous water flow fish ponds. *Ciências Agrárias, Londrina*, **32**(2):701-708.

Macintosh D.J., 2008. Risks Associated with Using Methyl Testosterone in Tilapia Farming. [en ligne] (Sans date) Adresse URL: <http://cmsdevelopment.sustainablefish.org.s3.amazonaws.com/2013/02/28/SFP%20MT%20paper-b3d73fec.pdf>, consulté le 01/10/2014.

Maghuin-Rogister G., 2002. Hormones, substances anabolisantes et résidus de traitements vétérinaires. In : Sécurité alimentaire du consommateur, 2^{ème} édition. M. Moll and N. Moll, coordonnateurs. Editions TEC & DOC. Collection Sciences et Techniques agroalimentaires, 65-92.

Magras C., Bouchot A. & Cappellet J-M., 2005. HACCP et production de poissons frais : exemple d'application en ferme marine aquacole. *Bulletin d'Académie Vétérinaire*, **158**(3): 275-281.

Mahmud Z.H., Wright A.C., Mandal S.C., Dai J., Jones M.K., Hasan M., Rashid M.H., Islam M.S., Johnson J.A., Gulig P.A., Glenn Morris J.Jr. & Ali A., 2010. Genetic characterization of *Vibrio vulnificus* strains from tilapia aquaculture in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(14): 4890-4895.

Mair G.C., Abucay J.S., Skibinski D.O.F., Abella T.A. & Beardmore J.A., 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**(2): 396-404.

Makilla D.M., 2014. Fish quality survey: *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Spp occurrence in Nile tilapia at informal markets of Nairobi. *Food Science and Quality Management*, **13**: 73-76.

Malle P. & Tao, S.H., 1987. Rapid quantitative determination of trimethylamine using stream distillation. *Journal of Food Protection*, **50**(9): 756-760.

Malle P. & M. Poumeyrol., 1989. A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine / Total volatile Basic nitrogen (%). *Journal of Food protein*, **52**(6): 419-423.

Mandal S.C., Hasan M., Rahman M., Manik M.H., Mahmud Z.H. & Islam D., 2009. Coliform Bacteria in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* of Shrimp-Gher, Pond and Fish Market. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, **1**(3): 160-166.

Mara D. & Cairncross S., 1989. Guide pour l'utilisation sans risques des eaux résiduaires et des excréta en agriculture et aquaculture: mesures pour la protection de la santé publique. Genève, *Organisation mondiale de la Santé*.

Marcel J., 2002. Les troubles de la reperfusion : Perspectives thérapeutiques, les lazéroïdes. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon I. 128pp.

Marcobal A., Rivas B. & Munoz R., 2006. Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, **1**(3): 187-196.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Marjani M., Jamili S., Mostafavi P.G., Ramin M. & Mashinchian A., 2009.** Influence of 17-Alpha Methyl Testosterone on masculinization and growth in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of fisheries and aquatic sciences*, **4**(1), 71-74.
- Marrone R., Vollano L., Chirollo C., Palma G. & Mercogliano, R., 2009.** Shelf life of different fish species stored with passive refrigeration (PRS). *Veterinary Research Communications*, **33**(1): 241-243.
- Marwah P., Marwah A. & Lardy H., 2005.** Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for 17-methyltestosterone in fish feed. *Journal of Chromatography B*, **824**: 107-115.
- Medale F., 2004.** Caractéristiques nutritionnelles des poissons et facteurs de variations. Sp. *Issue 10^{èmes} JSMTV*, 87-93.
- Medale F., 2005.** Caractéristiques nutritionnelles des poissons et facteurs de variations. *Aquaculture*, **79**: 87-93.
- Medale F., Leblanc J.C. & Gros P., 2008.** Le poisson : quels enjeux pour sa consommation? *LA Lettre Scientifique De l'Institut Français pour la Nutrition*, **130**: 1-20.
- Medale F., 2009.** Teneurs en lipides et composition en acides gras de la chair de poissons issues de la pêche et de l'élevage. *Cahiers de nutrition et de diététique*, **44**: 173-181.
- Medale F. & Kaushik S., 2009.** Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. *Cahiers Agricultures*, **18**(2-3): 103-111.
- Medale, F., 2010.** Pratiques d'élevage et qualité nutritionnelle des lipides des poissons. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, **17**(1): 47-51.
- Melton S.L., 1983.** Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology*, **37**(105): 111-116.
- Mendes R., Cardoso C. & Pestana C., 2009.** Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry*, **112**(4): 1038-1045.
- Mesmin B., 2007.** La reconnaissance de la courbure membranaire par ArfGAP1. Thèse de doctorat. Université de Nice-Sophia Antipolis, France. 298 p.
- Mexis S.F., Chouliara E. & Kontominas M.G., 2009.** Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Food Microbiology*, **26**(6): 598-605.
- Mietz J.L. & Karmas E., 1977.** Chemical quality index of canned tuna as determined by High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, **42**:155-158.
- Moeller V., 1954.** Distribution of amino acid decarboxylase in Enterobacteriaceae. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, **35**: 259-277.
- Montajami S., 2012.** Assessment the impact of 17-methyl testosterone on the growth and survival rate of Golden barb fish, *Puntius gelius* (Hamilton, 1822). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **12**(8), 1052-1055.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Multon J-L. & Davenas J.L., 1994. Qu'est-ce que la qualité d'un produit alimentaire et quels en sont les opérateurs ? In : MULTON J-L, ARTHAUD J-F, SOROSTE A., La qualité des produits alimentaires, Tec & Doc, 2^{ème} édition, 1994, 753 p.

-N-

Navarro R.D., Navarro F.K.S.P., Filho O.P.R., Ferreira W.M., Pereira M.M. & Filho J.T.S., 2012. Quality of polyunsaturated fatty acids in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) fed with vitamin E supplementation. *Food Chemistry*, **134**: 215–218.

NF V01-006., 2008. Hygiène des aliments - Place de l'HACCP et application de ses principes pour la maîtrise de la sécurité des aliments et des aliments pour animaux.

Nicolas J.-L., Gatesoupe F.J., Frouel S., Bachere E. & Gueguen Y., 2007. Quelles stratégies alternatives aux antibiotiques en aquaculture ? *INRA Productions Animales*, **20** (3), 253-258.

Niizeki N., Daikoku T., Hirata T., El-Shourbagy I., Song X. & Sakaguchi M., 2003. Mechanism of biosynthesis of trimethylamine oxide in tilapia reared under seawater conditions. *Fisheries Science*, **69**: 74–87.

Niven C.F., Jeffrey M.R. & Corlett D.A., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**: 321-322.

Noga E.J., 2000. Fish disease- Diagnosis and treatment. Iowa State University Press, 367 p.

Nol P., Rocke T. E., Gross K. & Yuill T. M., 2004. Prevalence of neurotoxic *Clostridium Botulinum* Type C in the gastrointestinal tracts of tilapia (*Oreochromis Mossambicus*) in the Salton Sea. *Journal of Wildlife Diseases*, **40**(3): 414-419.

Noorlis A., Ghazali F.M., Cheah Y.K., Tuan Zainazor T. C., Ponniah J., Tunung R., Tang J.Y.H., Nishibuchi M., Nakaguchi Y. & Son R., 2011. Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. *International Food Research Journal*, **18**: 689-695.

NRC, (National Research Council), 1993. Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes, revised edition. *National Academy Press*, Washington, D.C., USA. 225 p.

Nwabueze A. A. & Nwabueze E. O., 2011. Microbial flora of fish feeds sold in Asaba, Southern Nigeria. *American Journal of Experimental Agriculture*, **1**(2): 27-32.

Nwiyi P. & Onyeabor A., 2011. Occurrence of *Salmonella spp* from fresh fish (*tilapia nilotica* linn) using improved isolation methods. *Online Journal of Animal and Feed Research*, **2**(6): 475-478.

Nyong E.B. & Olubunmi F.J., 2014. Effect of storage and anti-nutritional components in stored pelleted fish feed. *International Journal of Science, Technology and Society*, **2**(6): 186-189.

-O-

Odoli C.O., 2009. Optimal storage conditions for fresh farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets. PhD thesis. University of Iceland. p92.

Oehlenschlager, J. & Rehbein, H., 2009. Basic facts and figures. In: Rehbein, H., Oehlenschläger, J. (Eds.), *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*. Blackwell, United Kingdom, pp. 1-18.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Okerman L., Noppe H., Cornet V. & De Zutter L., 2007. Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. *Food Additives and Contaminants*, **24**: 252- 257.

Okonko I.O., Adejoye O.D., Ogun A.A., Ogunjobi A.A., Nkang A.O. & Adebayo-Tayo B.C., 2009. Hazards analysis critical control points (HACCP) and microbiology qualities of sea-foods as affected by handler's hygiene in Ibadan and Lagos, Nigeria. *African Journal of Food Science*, **3**(2): 35-50.

OMS., 1989. Health Guidelines for the use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. WHO Technical Report Series, Number 778. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

OMS., 1999. Problèmes de salubrité poses par les produits de l'aquaculture. [En ligne] (Sans date) Adresse URL : <http://helid.digicollection.org/fr/d/Jwho74f/8.3.html>, consulté le 02/ 01/2011.

Onal A., 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, **103**(4): 1475-1486.

Osman H., Suria A.R. & Law E.C., 2001. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysia waters. *Food chemistry*, **73**(1), 55-60.

Oucif, H., Ali-Mehidi, S. & Abi-Ayad, S.-M.E.A., 2012. Lipid oxidation and histamine production in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) versus time and mode of conservation. *Journal of Life Sciences*, **6**: 713-720.

Ozogul Y., Ozyurt G., Ozogul F., Kuley E. & Polat A., 2005. Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chemistry*, **92**: 745-751.

Ozogul Y., Ozogul F., Kuley E., Ozkutuk S., Gokbulut C. & Kose, S., 2006. Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black sea, during chilled storage. *Food Chemistry*, **99**: 752-758.

Ozogul Y., Boga K.E., Tokur B. & Ozogul F., 2011. Changes in biochemical, sensory and microbiological quality indices of common sole (*Solea solea*) from the Mediterranean sea, during ice storage. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **11**: 243-251.

Ozyurt G., Kuley E., Ozkutuk S. & Ozogul F., 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food chemistry*, **114**: 505-510.

- P -

Paschoal J.A.R., Reyes F.G.R. & Rath S., 2009. Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia fillets by LC-ESI-MS-MS QToF. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **394**: 2213-2221.

Paschoalick T.M., Garcia F.T., Sobral P.J.A. & Habitante A.M.Q.B., 2003. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloids*, **17**: 419-427.

Pastoriza L., Bernardez M., Sampedro G., Cabo M.L. & Herrera J.J.R., 2008. Use of sterile and ozonized water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish. *Food Control*, **19**: 772-780.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Patange S. B., Mukundan M. K. & Ashok Kumar K., 2005.** A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Control*, **16**(5): 465-472.
- Pegg R.B., 2001.** Measurement of primary lipid oxidation products. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1-15.
- Penman D.J. & Mc Andrew B.J., 2000.** Genetics for the management and improvement of cultured tilapias. In *Tilapia: Biology and Exploitation*. Beveridge and McAndrew (Eds) Kluwer Academic Publishers. 227-266 pp.
- Petreska M., Ziberoski J. & Zekiri M., 2013.** Fish feed microbiological status. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, **4**: 16-19.
- Pettersson H., 2012.** Mycotoxin contamination of animal feed. **In:** Animal feed contamination Effects on livestock and food safety. Edited by Johanna Fink-Gremmels. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK. pp. 233-285.
- Phelps R.P., Fitzpatrick M.S., Contreras-Sanchez W.M., Warrington R.L. & Arndt J.T., 1999.** Detection of MT in pond Water after treatment with MT food. In: K. Mcelwee, D. Burke, M. Niles, and H. Egna (Editors), Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp. 57-59.
- Phelps R.P. & Popma T.J., 2000.** Sex reversal of tilapia: In BA Costa-Pierce, JE Rakocy, eds. *Tilapia Aquaculture in the Americas*, Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, 34-59.
- Pikkemaat M., Dijk S.O., Schouten J., Rapallini M. & Van Egmond H.J. 2008.** A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food Control*, **19**: 781-789.
- Pikkemaat M.P., 2009.** Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**: 893-905.
- Pillay T.V.R., 1990.** Aquaculture principles and practices. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK.
- Plumb J. A. & Hanson L. A., 2010.** Tilapia bacterial diseases, in *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*, Third Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470958353.ch16
- Poher I., Blanc G. & Loussouarn S., 1997.** Pharmacokinetics of oxolinic acid in sea-bass *Dicentrarchus labrax* (L., 1758), after a single rapid intravascular injection. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**: 267-275.
- Poher I. & Blanc G., 1998.** Pharmacokinetics of a discontinuous absorption process of oxolinic acid in turbot, *Scophthalmus maximus*, after a single oral administration. *Xenobiotica*, **28**(11): 1061-1073.
- Pouliquen H. & Le Brie H., 1996.** Sorption of oxolinic acid and oxytétracycline to marine sediments. *Chemosphere*, **33**(5): 801-815.
- Pozo O. J., Eeno P. V., Deventer K., Lootens L., Thuyne W. V., Parr M. K., Schanzer W., Sancho, J. V., Hernandez F. Meuleman P., Leroux-Roels G. & Delbeke F. T., 2009.** Detection and Characterization of a New Metabolite of 17-Methyltestosterone. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**(2): 2153-2162.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Prester, L., 2011. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, **28**(11): 1547-1560.

Pridgeon J.W., Klesius P.H., Lewbart G.A., Daniels H.V. & Jacob M., 2014. *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) are virulent to channel catfish and Nile tilapia. *Journal of Coastal Life Medicine*, **2**(5): 337-343.

-R-

Rahardjo S. & Sofos J.N., 1993. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Science*, **35**: 145-169.

Rasco B., 2010. Perceptions of seafood safety. *Journal of the world aquaculture society*, **41**(2): 258-265.

Reda R. M., Ibrahim R.E., El-Nobi G. A. & El-Bouhy Z.M., 2013. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **39**: 241-248

Regost C., 2001. Effets des lipides sur la qualité nutritionnelle, physique et organoleptique de la chair de la truite fario (*salmo trutta*) et du turbot (*psetta maxima*). Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1. 189 pp.

Reig M. & Toldra F., 2008. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, **78**: 60-67.

Reilly A & Kaferstein F., 1997. Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture Research*, **28**(10), 735-752.

Rezaei M., Montazeri N., Langrudi H.E., Mokhayer B., Parviz M. & Nazarinia A., 2007. The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. *Food Chemistry*, **103**: 150-154.

Rezaei M. & Hosseini S.F., 2008. Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of Food Science*, **73**(6): 93-96.

Rigos G., Nengas I., Alexis M., Tyrpenou A.E. & Troisi G.M., 2003. Tissue distribution and residue depletion of oxolinic acid in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) following multiple in-feed dosing. *Aquaculture*, **224**: 245-256.

Rinchart J., Dabrowski K., Garcia-Abiado M.A. & Ottobre J., 1999. Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: Effect on plasma steroids and sex reversal. *Steroids*, **64**: 518-525.

Rizkalla E.H.; Haleem H.H.; Abdel-Halim A.M.M. & Youssef R.H., 2004. Evaluation of using 17 α -methyl testosterone for monosex *Oreochromis niloticus* fry production. *Egyptian German Society for Zoology*, **43**(a): 315-335.

Rocha R., Oliveira Leite L., De Sousa O.Viana. & Dos Fernandes Vieira R.H.S., 2014. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from fresh-marketed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Pathogens*, **2014**: 1-5.

Rodier J., Legube B. & Merlet N., 2009. L'analyse de l'eau, 9^{ème} édition. DUNOD (éditeur), Paris, France. 1579 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Rodrigues B., Alvares T.S., Da Costa M.P., Sampaio G.S.L., De la Torre C.A.L., Marsico E.T. & Conte Junior C.A., 2013. Concentration of biogenic amines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) preserved in ice and its relationship with physicochemical parameters of quality. *Journal of Aquaculture Research & Development*, **4**(3): 1-4.

Rodriguez A., Carriles N., Cruz J.M. & Aubourg S.P., 2008. Changes in the flesh of cooked farmed salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with previous storage in slurry ice (-1.5°C). *LWT - Food Science and Technology*, **41**: 1726-1732.

Rogstad A., Ellingsen O.F.B. & Syvertsen C., 1993. Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of administration to Atlantic salmon in seawater. *Aquaculture*, **110**: 207-220.

Rolain J-M., 2013. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, **173**(4) 1-10.

Rome L.C., Funke R.P., Alexander R. McN, Lutz G., Aldridge H., Scott F. & Freadman M., 1988. Why animals have different muscle fibre types. *Nature*, **335**: 824-827.

Romerio M-P. C. S., Fenerich-Verani N., Santo De-Campos B. E. & Da-Silva A. S., 2000. Masculinization of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using different diets and different doses of 17-alpha methyl testosterone. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **29**(3): 654-659.

Romero J., Feijoo C.G. & Navarrete, P., 2012. Antibiotics in Aquaculture- Use, Abuse and Alternatives. In: Edmir Carvalho (Ed.), Health and Environment in Aquaculture, ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech, Available from: <<http://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibioticsin-aquacultureuse-abuse-and-alternatives>>.

Rougeot C., Prignon C., Nguouana Kengne C.V. & Mélard C., 2008. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, **276**: 205-208.

Russo R., Mitchell H. & Yanong R. P. E., 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture*, **256**(1-4): 105-110.

Russo P., Spano G., Arena M.P., Capozzi V., Fiocco D., Grieco F. & Beneduce L., 2010. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial*, 1087-1095.

- S -

Sae-leaw T., Soottawat Benjakul, Gokoglu N. & Nalinanon S., 2013. Changes in lipids and fishy odour development in skin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored in ice. *Food Chemistry*, **141**: 2466-2472.

Salih A.M., Smith D.M., Price J.F. & Dawson, L.E. 1987. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry science*, **66**: 1483-1488.

Samanido V., Evaggelopoulou E., Trotsmuller M., Guob X. & Lankmayr E., 2008. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, **1203**: 115-123.

Sampels S., 2013. Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. Food industry, In Tech, Rijeka, Croatia, 115-144.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Samuelsen O., Ervik A., Pursell L. & Smith P., 2000.** Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater and in vitro antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, **187**(3-4): 213-224.
- Samuelsen O.B. & Bergh O., 2004.** Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, **235**: 27-35.
- Samuelsen O.B. 2006.** Multiple dose pharmacokinetic study of oxolinic acid in cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture International*, **14**: 443-450.
- Santos D.M.Silva., Cruz C.F., Pereira D.P., Coelho Alves L.M. & Ruas de Moraes F., 2012.** Microbiological water quality and gill histopathology of fish from fish farming in Itapecuru-Mirim County, Maranhão State. *Maringá*, **34**(2): 199-205.
- Sanz D., Mata L., Condon S., Sanz MA. & Razquin P., 2010.** Performance of a new microbial test for quinolone Residues in muscle. *Food Analytical Methods*, **4**: 212-220.
- Schneider M.J. & Donoghue D.J., 2004.** Comparison of a Bioassay and a Liquid Chromatography Fluorescence-Mass Spectrometry Method for the Detection of Incurred Enrofloxacin Residues in Chicken Tissues. *Poultry Science*, **83**: 830-834.
- Scippo M.-L. & Maghuin-Rogister G., 2006.** Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse. *Annales de MédecineVétérinaire*, **150**: 125-130.
- Scott P., 1993.** Therapy in aquaculture. In: Brown L, ed. *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Oxford, England: Pergamon Press, 131-152.
- Seibel B.A. & Walsh P.J., 2002.** Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *The Journal of Experimental Biology*, **205**: 297-306.
- Selim K.M., El-hofy H. & Khalil R.H. 2014.** The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B 1 -induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, **22**: 523-540.
- Servais S., 2004.** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga 3. Thèse de doctorat. 127 pp. Université Claude Bernard-Lyon I. Lyon, France.
- Shahidi F., Wanasundara U. & Brunet N., 1994.** Oxidative stability of oil from blubber of harp seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures. *Food Research International*, **27**: 555-562.
- Shakila R. J., Vasundhara T.S. & Kumudavally K.V., 2001.** A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*, **75**: 255-259.
- Shakila R.J. & Vasundhara T.S., 2002.** Formation of histamine and other biogenic amines during storage of freshwater fish chunks. *Asian Fisheries Science*, **15**: 1-6.
- Shakila R.J., Vijayalakshmi K. & Jeyasekaran G., 2003.** Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chemistry*, **82**: 347-352.
- Shalaby A.R., 1995.** Multidetecion, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, **52**: 361-312.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shalaby A.R., 1999.** Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, **65**: 117-121.
- Sheridan, M.A., 1988.** Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **90**(4): 679-690.
- Shewan J.M., 1962.** The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent Advances in Food Science*, **1**: 167-193.
- Shi C., Cui J., Lu H., Shen H. & Luo Y., 2012.** Changes in biogenic amines of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at different temperatures and their relation to total volatile base nitrogen, microbiological and sensory score. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**(15): 3079-84.
- Shi C., Lu H., Cui J., Shen H. & Luo Y., 2014.** Study on the predictive models of the quality of Silver carp (*hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored under variable temperature conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, **38**: 356-363.
- Shore L.S. & Shemesh M., 2003.** Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry*, **75**: 1859-1871.
- Sil S., Joseph J. & Kumar K. A., 2008.** Changes in biogenic amines during iced and ambient temperature storage of tilapia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**(12): 2208-2212.
- Smith C.E. & Piper R.G., 1975.** Lesions associated with chronic exposure to ammonia. In: W.E. Ribelin, Migah, G. (eds.). *The pathology of fishes*. Univ. of Wisconsin Press, Madison, WI, p. 497-514.
- Smith P., 1998.** Towards the establishment of a breakpoint concentration for the determination of resistance to oxolinic acid in marine microflora. *Aquaculture*, **166**(4): 229-239.
- Sonda-Santos K.Y. & Lara-Flores M., 2012.** Detection of *Mycobacterium* spp. by polymerase chain reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Campeche, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, **6**(11): 2785-2787.
- Stead S., Sharman M., Tarbin J.A., Gibson E., Richmond S., Stark J. & Geijp E., 2004.** Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food Additives and Contaminants*, **21**(3): 216-221.
- Stead S., Ashwin H., Richmond S.F., Sharman M., Langeveld P.C., Barendse J.P., Stark J. & Keely B.J., 2008.** Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest[®] SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal*, **18**: 3-11.
- Stoilova N. & Petkova M., 2010.** Developing and validation of method for detection of quinolone residues in poultry meat. *Trakia Journal of Sciences*, **8**: 64-69.
- Stolker A.A.M. & Brinkman U.A.T., 2005.** Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. *Journal of Chromatography A*, **1067**(1-2) : 15-53.
- Stoltz R., 2008.** Les Résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : évaluation et maîtrise de ce danger (PhD Thesis). Université de Lyon, 117 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Suloma A., Ogata H.Y., Garibay E.S., Chavez D.R. & El-Haroun E.R., 2008. Fatty acid composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* muscles: a comparative study with commercially important tropical freshwater fish in Philippines. *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 921-932.

- T -

Tao Z., Sato M., Han Y., Tan Z., Yamaguchi T. & Nakano, T., 2011. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination. *Food Control*, **22**(8): 1154-1157.

Teichert-Coddington D., Manning B., Eya J. & Brock D., 2000. Concentration of 17 alpha-methyltestosterone in hormone treated feed: effects of analytical technique, fabrication and storage temperature. *Journal of the World Aquaculture Society*, **31**(1):42-50.

Tessema M., Muller-Belecke A. & Horstgen-Schwark G., 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, **258**: 270-277.

Tocher D.R., Agaba M., Hastings N., Bell J.G., Dick J.R. & Teale A.J., 2002. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **24**: 309-320.

Tokur B., Polat A., Beklevik G. & Ozkutuk S., 2004. Changes in the quality of fishburger produced from tilapia (*Oreochromis niloticus*) during frozen storage (-18C°). *European Food Research and Technology*, **218**(5):420-423.

Tongnuanchan P., Benjakul S. & Prodpran T., 2011. Roles of lipid oxidation and pH on properties and yellow discolouration during storage of film from red tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle protein. *Food Hydrocolloids*, **25**: 426-433.

Trewavas E., 1983. Tilapias: Taxonomy and Speciation. In : Pullin & Maclean (eds). Second International Symposium on Tilapia in aquaculture, march 1987, *Thailand ICLARM conference Proceedings*, **15**: 3-13.

Tu C.Y., Ho S.P., Hung S.W., Chen B.R., Tsou L.T. & Wang W.S., 2006. Development of a Technique to detect the residue of oxolinic acid in the serum and muscle of chinese mitten Crab, *Eriocheir Sinensis*. *Journal of Food and Drug Analysis*, **14**: 391-397.

Tuckey N.P.L., Forgan L.G. & Jerrett A.R., 2012. Fillet colour correlates with biochemical status in Australasian snapper (*Pagrus auratus*) during storage in refrigerated seawater. *Aquaculture*, **356-357**: 256-263.

Tyrpenou A.E., Kotzamanis Y.P. & Alexis M.N., 2003. Flumequine depletion from muscle plus skin tissue of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed flumequine medicated feed in seawater at 18 and 24°C. *Aquaculture*, **220**: 633-642.

- U -

Ueno R., Sangrungruang K. & Miyakawa M., 1999. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, **32**: 629-633.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Undeland I., Hultin H.O. & Richards M.P., 2002. An aqueous fraction of cod muscle inhibits hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *32nd Annual WEFTA Meeting*, May 13th-15th, Galway (Ireland) 90.

Uno K., 2004. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **230**:1-11.

-V-

Valfré F. & Moretti V.M., 1991. Characteristics, quality and control of animal products for human consumption. In "Proc. The Round Table. The livestock production sector in Eastern Europe a affected by current changes." Vol. 54. EAAP Publ. pp. 144-148.

Valls J.E., Bello R.A. & Kodaira M.S. 2002. Semiquantitative analysis by Thin-Layer Chromatography of biogenic amines in dried, salted and canned fish products. *Journal of Food Quality*, **25**:165-176.

Van Der Boch H., 1980. Intracellular phospholipases A. *Biochimica et Biophysica Acta*, **604**: 191-246.

Van De Vis J.W., Poelman M., Lambooij E., Bégout M-L. & Pilarczyk M., 2012. Fish welfare assurance system: Initial steps to set up an effective tool to safeguard and monitor farmed fish welfare at a company level. *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**(1): 243-257.

Van Hoof V., De Wasch K., Okerman I., Reybroeck W., Poelmans S., Noppe H. & De Brabander., 2005. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta*, **529**: 265-272.

Veciana-Nogues M.T., Marine-Font A. & Vidal-Carou M.C., 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP related compounds, volatile and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 2036-2041.

Vick A. M., & Hayton W. L., 2001. Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **52**:177-188.

Vidacek S., 2014. Seafood. In: Food Safety Management- A Practical Guide for the Food Industry. Edited by Yasmine Motarjemi, & Huub Lelieveld. Academic Press of Elsevier. pp. 189-213.

-W-

Wanasundara U.N., Shahidi F. & Jablonski C.R., 1995. Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils. *Food Chemistry*, **52**:249-253.

Wandili S.A., Onyango D.M. & Waindi N.E., 2011. Characterisation of *Salmonella* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) along lake Victoria beaches in Western Kenya. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **56**: 1397-1402.

Wang L.H. & Tsai C.L., 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology*, **286**: 534-537.

Wang F., Jiang L., Yang Q., Han F., Chen S., Pu S., Vance A. & Ge B., 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of major foodborne pathogens in imported seafood. *Journal of Food Protection*, **74**(9): 1451-1461.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Watanabe W.O., Losordo T.M., Fitzsimmons K. & Hanley F., 2002. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, **10**(3-4): 465-498.

Wessels S. & Horstgen-Schwark G., 2007. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture*, **272**: 80-87.

Weber J., Bochi V.C., Ribeiro C.P., Victorio A.D-M. & Emanuelli T., 2008. Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. *Food Chemistry*, **106**:140-146.

White P.J. 1995. Conjugated diene, anisidine value, and carbonyl value analyses. In: Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods (K. Warner & N.A.M. Eskin, eds.) pp. 159-178. AOCS Press, Champaign, Ill.

White J.R., Belmont M.A. & Metcalfe, C.D., 2006. Pharmaceutical compounds in wastewater: wetland treatment as a potential solution. *Scientific World Journal*, **6**: 1731-6.

- X -

Xing Y., Feng-Ying G., Qing-Mei Z., Jun-Jie B., Huan W., Hai-Hua L. & Qing J., 2009. Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme. *Molecular Biology Reports*, **36**: 1239-1246.

Xu C. L., Chu X. G., Peng C. F., Jin Z. Y. & Wang L. Y., 2006. Development of a faster determination of 10 anabolic steroids residues in animal muscle tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**(2): 616-621.

- Y -

Yamprayoon J. & Sukhumparnich K., 2010. Thai Aquaculture: achieving quality and safety through management and sustainability. *Journal of the World Aquaculture Society*, **41**(2): 274-280.

Yarnpakdee S., Benjakul S., Nalinanon S. & Kristinsson H.G., 2012. Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chemistry*, **132**: 1781-1788.

Yilmaz S. & Ergun S., 2014. Dietary supplementation with allspice *pimentadioica* reduces the occurrence of streptococcal disease during first feeding of mozambique tilapia fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, **26**(3): 144-148.

Yurchenko S. & Molder U., 2006. Volatile n-nitrosamines in various fish products. *Food Chemistry*, **96**: 325-333.

- Z -

Zaman M.Z., Abdulmir A.S., Abu Bakar F., Zukhrufuz M., Selamat J. & Bakar J., 2009. A review: microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *American Journal of Applied Sciences*, **6** (6): 1199-1211.

Zhang X., Zhang W., Xue L., Zhang B., Jin M. & Fu W., 2010. Bioremediation of bacteria pollution using the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **105** (1): 59-68.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zhou R., Liu Y., Xie J. & Wang X., 2011. Effects of combined treatment of electrolysed water and chitosan on the quality attributes and myofibril degradation in farmed obscure puffer fish (*Takifugu obscurus*) during refrigerated storage. *Food Chemistry*, **129**: 1660-1666.

Zmysłowska I. & Lewandowska D., 2000. The effect of storage temperatures on the microbiological quality of fish feeds. *Polish Journal of Environmental Studies*, **9**(3): 223-226.

ANNEXES

Full Length Research Paper

Microbial, biochemical and sensorial quality assessment of Algerian farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored at 4 and 30°C

Dergal N. B.^{1,2*}, Abi-Ayad S. M. E. A.², Degand G.¹, Douny C.¹, Brose F.¹, Daube G.³, Rodrigues A.³ and Scippo M. L.¹

¹Laboratory of Food Analysis, Department of Food Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, bât. B43bis, Bld de Colonster 20, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium.

²Laboratory of Aquaculture and Bioremediation (AquaBior), Department of Biotechnology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Oran, B.P. 1524, El M'Naouer, Oran 31000, Algeria.

³Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, bât. B43 bis, Bld de Colonster 20, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium.

Accepted 30 October, 2013

The quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) produced in Algeria was assessed after refrigerated (4°C) storage as well as ambient temperature (30°C) keeping, corresponding to usual fish selling conditions in Algeria. Sensorial, microbial and biochemical analyzes were conducted in parallel. Moreover, the nutritional quality of fresh tilapia was also assessed by determining the proximate composition and the fatty acids profile. Results of lipid oxidation, namely hydroperoxydes and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), proteolysis, represented by total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine (TMA-N), sensory assessment and bacterial load were highly correlated. They demonstrated that the shelf life of tilapia is limited to 12 h and five days of storage at 30 and 4°C respectively. After these period of time, fish was rejected by sensorial analysis and all the parameters thresholds (fixed in the present study at 0.85 mg MDA kg⁻¹ of wet weight for TBARS, 35 mg TVB-N 100 g⁻¹ of flesh, 8 mg TMA-N 100 g⁻¹ of flesh and 6 log cfu g⁻¹ for total viable count) were exceeded.

Key words: Shelf life, *Oreochromis niloticus*, fatty acid profile, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), trimethylamine (TMA), hydroperoxydes.

INTRODUCTION

In Algeria, aquaculture has clearly evolved and become a priority of the government to offset the deficit of fishery products. New continental freshwater species such as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were introduced. The intensive farming of tilapia, *Oreochromis* sp. is rapidly expanding and tilapias are the second most widely farmed fish in the world with annual production exceeding 3 million tons in 2010 (FAO, 2012).

Tilapias have many attributes that make them an ideal candidate for promoting aquaculture and provide sustainable development in Algeria. These include: fast growth, tolerance to a wide range of environmental conditions, resistance to stress and disease, ability to reproduce in captivity, feeding on low trophic levels and good sensorial properties of flesh (Boari et al., 2008). Freshwater fish represent an important source of high-

*Corresponding author. E-mail: dergalnadir@gmail.com. Tel: +213559925333. Fax: +21341325958.

quality proteins and other elements for human nutrition (Dhanapal et al., 2012; Navarro, et al., 2012). However, fresh fish is a highly perishable product (Gram and Huss, 1998). Immediately after its death, the fish undergo a natural and complex decomposition process, that is, microbial, chemical and enzymatic (Huss, 1995). The freshness of fish is reduced by the oxidative rancidity (Azhar and Nisa, 2006), the organoleptic properties are rapidly deteriorated, the nutritional value is reduced and toxic substances are formed (Huss, 1995).

Fish lipids are characterized by their high content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) of $\omega 3$ series such as eicosapentaenoic (EPA C20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA C22:6 n-3). However, these lipids are very susceptible to oxidation reactions (Ozogul et al., 2011). These reactions lead to the formation of primary products such as hydroperoxides, which are very unstable compounds quickly transformed into secondary products such as toxic aldehydes (Rezaei and Hosseini, 2008), measurable as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (Yampakdee et al., 2012). In addition, the shelf-life of fresh fish is usually limited by bacterial activity and/or enzymatic degradation of trimethylamine oxide (TMAO) (Gram and Dalgaard, 2002). The specific spoilage organisms (SSO) utilize the available TMAO in anaerobic respiration and produces off-odors following the formation of TMA (Gram and Huss, 1998). Marine fish and some freshwater fish such as tilapia (Niizeki et al., 2003) contain TMAO. Trimethylamine (TMA), ammonia (NH_3) and dimethylamine (DMA) as well as levels of total volatile basic nitrogen (TVB-N), are useful indices of fish freshness (Ozogul et al., 2005). The TVB-N parameter represents a quality index of fish and reflects its bacterial and enzymatic proteolysis (Zhou et al., 2011). Temperature is the main environmental factor that affects growth and viability of SSO and consequently determines fish shelf life.

This work aimed at chemical, microbial and sensory assessment of the Algerian farmed tilapia under refrigerated (4°C) and ambient (30°C) storage conditions, the later been usual conditions of fish selling in local Algerian markets. Furthermore, this study provides information on fatty acids profile and macronutrients composition of fresh raw tilapia to characterize its nutritional quality.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A total of 136 farmed tilapia (*O. niloticus*) were obtained from a local aquafarm "Fat-Step", 250 km from south west of Oran (ALGERIA), and brought alive to the faculty's laboratory (Laboratory of Aquaculture and Bioremediation- AquaBior). Fish were of commercial size (correspondent to 5 months of breeding) and weighing 120-160 g. They were not separated according to gender. Upon arrival, tilapias were divided into two batches and sacrificed using a lethal dose (200 mg l⁻¹) of anaesthetic (Benzocaine, Sigma). The first lot was stored in the refrigerator at 4°C and the second lot was kept in plastic box at ambient temperature (30°C).

Sampling procedure was carried out two times in order to assess all the biochemical, microbiological, nutritional and sensory parameters. A first sampling of 95 tilapias was needed to evaluate oxidation reactions (TBARS and hydroperoxides measurement). For the first 12 h, five samples were taken at 3 h intervals from both studied batches. Then, a daily interval of sampling (n = 5) was planned until the third day for the ambient lot (30°C) and the seventh day for the refrigerated one (4°C). Thereafter, 36 tilapias were sampled a second time to evaluate the rest of biochemical (TVB-N, TMA-N, pH), sensorial and microbiological analysis on the same individuals. Samples from both storage conditions (30 and 4°C) were analyzed in triplicate at 6 h intervals after sacrifice, during the first day of storage, then at a daily interval for up to 5 days for the refrigerated samples only.

Proximate composition and fatty acids profile

To characterize the Algerian farmed tilapia, the moisture content of raw tilapia was determined according to ISO 1442 (1997) method. The water activity (a_w) was determined by using a Thermoconstanter TH200 Novasina (Novasina, Switzerland) according to ISO 21807 (2004) method. Fat was determined according to ISO 1444 (1996) method using the Soxhlet extraction technique. The total protein content was determined according to ISO 937 ((1978) method and calculated by multiplying the total nitrogen content determined by the Kjeldahl's method by 6.25. The ash content was carried out using the ISO 936 (1998) method. Triplicate samples of dorsal muscle were analyzed from the fresh tilapias.

To determine the fatty acid composition, total lipids of the fish muscle were first extracted using the method described by Folch et al. (1957). One hundred mg of fat were then used for the saponification/methylation of the fatty acids. Methylation was performed using KOH/MeOH (0.5 N) (3 x 20 min at 70°C) followed by HCl/MeOH (1/1; v/v) (20 min at 70°C). Tridecanoic acid (C13:0) was used as an internal standard to quantify the fatty acids and nonadecanoic acid methyl ester (C19:0-ME) was used as injection standard. The fatty acid methyl esters (FAME) were separated by gas chromatography (Focus GC, ThermoFinnigan, USA) using a CP-Sil88 column for FAME (100 m x 0.25 mm, 0.2 μm) (Varian Inc., USA) and analyzed with an Ion trap PolarisQ mass spectrometer (MS) (ThermoFinnigan, USA).

The GC conditions were: inlet: 250°C; splitless injection; helium as the carrier gas at 1.5 ml/min; temperature program: 55°C for 1 min, followed by an increase of 5°C·min⁻¹ to 180°C, then 10°C·min⁻¹ to 200°C for 15 min, then an increase of 10°C·min⁻¹ to 225°C for 12 min; total run time was 57.50 min. The peaks were identified by comparing their mass spectrum and retention times with those of the corresponding standards (Sigma-Aldrich, Belgium). The MS conditions were: transfer line: 250°C; ion source: 220°C; collision energy: 35 eV; full scan: 50-650 from 18 to 57.50 min. In each chromatographic run, different ions were monitored for each fatty acid analyzed, which facilitated detection and quantitative analysis. A calibration curve was performed for each of the 23 fatty acids determined. The fatty acids concentrations were determined by duplicates analysis (with a maximum variability of 10% between duplicate results) and expressed as percentage of total fatty acids.

Sensory analysis

Sensory evaluation of tilapia was carried out by three semi-trained panelists (laboratory staff) according the scheme of the Quality Index Method (QIM) of Balas-Nogueras et al. (2003). Triplicate samples were taken from each of the two storage conditions at regular intervals. Fishes were examined physically for general appearance of skin, consistency of flesh, smell and color of gills and finally the clarity of the cornea, color of pupil and shape of eyes. Each single descriptor was associated to demerit points from

0 to 3 (Balxas-Nogueras et al., 2003) and the range of total demerit point (score) was from 0 to 19 (19 been the acceptability limit).

Microbial analysis

Total viable counts (TVC) were determined on plate count agar (PCA) in depth at 30°C for 72 h, and Enterobacteriaceae (ENT) were determined on violet red bile glucose agar (VRBG) in depth at 30°C for 24 h according to ISO methods 4833 (2003) and 21528-1 (2004), respectively. Microbiological data were expressed as logarithms of the number of colony-forming units per gram (log cfu/g).

Analytical methods

The pH was measured directly from tilapia's muscle using a pH meter Knick type 765 and a combined pH electrode (Ingold ref. 104063123) according to ISO 2917 (1999) method. Measurement was performed in three different zones of each sample and values were averaged. The TVB-N content of tilapia was extracted according to the European official method described in regulation (EC) 2074/2005 then assayed by a reverse titration and expressed as mg TVB-N per 100 g tilapia flesh.

To assay specifically nitrogen generated by the TMA, the same distillation method was applied in presence of formaldehyde. Formaldehyde can block the primary and secondary amines (Malle and Tao, 1987). Hydroperoxides were determined according to the method described by Eymard and Genot (2003) and the results were expressed as mmole of cumene hydroperoxide equivalents (mmole Eq CuOOH) per kg of wet weight. TBARS were expressed as mg of malonaldehyde equivalents per kg of wet weight (mg MDA kg⁻¹) and determined according to the method of Genot (1996) which is modified from the methods of Bostoglou et al. (1994).

Statistical analysis

All data were subjected to variance analyses (ANOVA one way), and differences between means were evaluated by the Tukey test (significance $p < 0.05$) using the statistical software SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). The correlation between different parameters in the study was carried out by the Pearson's chi-square test. The results of statistical analysis are shown as mean values \pm standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition and fatty acid profile of tilapia (*O. niloticus*)

The macronutrient composition of tilapia was $17.3 \pm 0.4\%$ protein, $0.33 \pm 0.03\%$ fat, $80.7 \pm 0.4\%$ moisture and $0.59 \pm 0.12\%$ ash. The water activity was 0.99 indicating that fish was a favorable environment for the growth of bacteria. The total lipid percentage of Algerian farmed tilapia (0.3%) was lower than the published data from literature whose values varied from $1.1 \pm 0.2\%$ to $2.5 \pm 0.27\%$ (De Souza et al., 2007; Suloma et al., 2008; Elagba and Al-Sabahi, 2011; Navarro et al., 2012; Dhanapal et al., 2012). The results of fatty acid profiles of Algerian farmed tilapia and tilapias fishes provided by the Research and Education Center in Aquaculture (CEFRA)

are reported and compared with other fatty acid profile from literature in Table 1.

The results show that the lipid fatty acid composition varied between the different sources of tilapia. The sexual variations, fish size, season and environmental conditions, mode of breeding, rearing practices and especially the fatty acid composition of the feed influence the fatty acid content of farmed fish (De Souza et al., 2007; Elagba and Al-Sabahi, 2011; Navarro et al., 2012). Algerian Nile tilapia (*O. niloticus*) is a good source of PUFA. The PUFA's proportion prevails and exceeds 57% of total fatty acids. This species provides an important contribution to omega-3 fatty acids intake for consumers (18.33% of total fatty acids); most of them being eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), known to prevent heart diseases and attenuate inflammatory processes (Navarro et al., 2012).

Sensory assessment

Figure 1 shows the results of the sensory analysis of tilapia (*O. niloticus*) stored at 4 and 30°C. The quality of tilapia significantly declined, showing one plateau at the acceptability limit (score = 19) after 12 h of storage at ambient temperature, and two plateaus respectively between the 6th hour and the 24th h, and between day 2 and 3 during the storage at 4°C.

The quality of fresh fish was scored as excellent (score = 7), than was judged as acceptable (score = 14) until the 6th h at 30°C and the 3rd day at 4°C. After that, the quality of fish started to decrease due to formation of yellowish grey mucus, loss of pigmentation, unpleasant odors and flavors in the gills and flabby flesh. Fish were no longer acceptable and scored as inedible after 5 days at 4°C and only 12 h at 30°C. Similar results were obtained for whole tilapia stored at ambient temperature (Adoga et al., 2010). Red tilapia (*Oreochromis* sp.) was scored as acceptable up to 15 h at $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (Bakar and Izzah, 1995).

Pastoriza et al. (2008) showed similar delay (5 days) for the rejection of hake (*Merluccius merluccius*) under refrigerated storage. Ouif et al. (2012) reported that only three days are necessary for the rejection of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) conserved at 4°C. Otherwise, most often, a delay of one week on average is granted for the refrigeration of different species of fish (Ozogul et al., 2005; Rezaei and Hosseini, 2008; Tuckey et al., 2012).

Evolution of bacterial load

The muscle of live fish is sterile. But a high load of bacteria is present on the surface of the skin, on the gills and in the digestive tract. After death, the immune system collapses allowing the bacterial proliferation. The bacteria on the skin surface colonize the scale pockets and invade the flesh during storage (Gram and Huss, 1996). Fish

Table 1. Fatty acid profile (expressed as % of total fatty acids) of Algerian farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*), CEFRA tilapia and from literature.

Fatty acid	Algerian tilapia (this study)	CEFRA tilapia (this study)	De Souza et al. (2007)	Suloma et al. (2008)	Elagba and Al-Sabahi (2011)	Navarro et al. (2012)	Dhanapal et al. (2012)
Palmitic	19.4	23.1	14.8	23.9	24.2	24.6	28.3
Stearic	10.0	8.2	5.9	9.2	22.5	6.2	8.4
Σ SFA	29.4	31.3	23.5	43.2	64.2	37.3	46.6
Palmitoleic	1.4	4.8	1.6	2.2	12.6	4.3	9.4
Oleic	11.3	13.1	21.1	3.3	3.8	34.1	20.6
Σ MUFA	12.7	17.9	29.5	12.0	21.5	41.2	36.0
Linoleic	13.5	8.5	29.2	1.4	1.5	13.3	9.2
γ-Linolenic	1.7	-	1.3	0.4	0.9	0.3	-
Eicosadienoic	2.1	-	2.1	0.2	0.2	-	-
Eicosatrienoic	4.8	5.0	1.3	0.5	1.06	-	1.2
Arachidonic	17.4	7.6	4.0	9.4	-	-	2.0
Σ n-6	39.5	21.1	43.1	17.7	4.7	13.6	12.4
α-Linolenic	1.8	-	1.2	0.6	-	0.6	2.4
Eicosapentaenoic	2.4	4.8	-	4.5	-	0.5	0.3
Docosapentaenoic	3.9	7.8	0.5	5.1	-	-	0.8
Docosahexaenoic	10.3	17.1	2.0	16.3	4.0	-	0.9
Σ n-3	18.4	29.7	3.9	27.1	9.6	3.5	5.0
Σ n-6 / Σ n-3	2.1	0.7	11.0	0.6	0.5	3.9	2.5
Σ PUFA	67.9	50.8	47.0	44.8	14.3	17.1	17.4

Twenty three fatty acids were measured in both Algerian and CEFRA tilapia. Only those detected in Algerian tilapia are shown. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; -, not detected; CEFRA: Research and Education Center in Aquaculture.

flesh has a particular nature, which make it highly susceptible for bacterial growth. The flesh have a post mortem pH greater than 6.0 as intrinsic factor, in addition to the important fraction of non-protein-nitrogen (NPN) as subtract offering free amino acids, nucleotides and TMAO (Gram and Dagaard, 2002). Microbial counts on the tilapia (*O. niloticus*) kept at 4 and 30°C are shown in Figure 2A and B, respectively. An initial total viable count (TVC) of tilapia was 3.1 log cfu g⁻¹ and initial enterobacteriaceae counts (ENT) of tilapia was 2.8 log cfu g⁻¹ for the first sampling.

The bacterial population at 30°C, significantly ($p < 0.05$) and rapidly increased to 7.3 log cfu g⁻¹ for TVC and to 6.8 log cfu g⁻¹ for ENT over the period of storage (1 day). On the other side, the bacterial evolution at 4°C: increased slowly during the first 3 days of storage then reached a maximum of 7 log cfu g⁻¹ for TVC and 6.3 log cfu g⁻¹ for ENT. A microbial safety criterion of 6 log cfu g⁻¹ is applied for determining storage life of fresh seafood (ICMMSF, 1986). The shelf-life of tilapia was thus approximately 12 h for ambient storage and 5 days for the refrigerated one, were the TVC

loading exceeded the microbiological threshold. Our results confirm that the fish's spoilage was affected by the storage mode (Huss, 1995) and that there is a linear relationship between spoilage rate and storage temperatures. Chilling slows down microbial activities in fish relative to ambient storage. Similar results were obtained by Adoga et al. (2010) concerning the TVC loading in tilapia (*O. niloticus*) at ambient temperature. For the refrigerated samples, the results were consistent with the data obtained by Zhou et al. (2011) describing the preservation of whole obscure

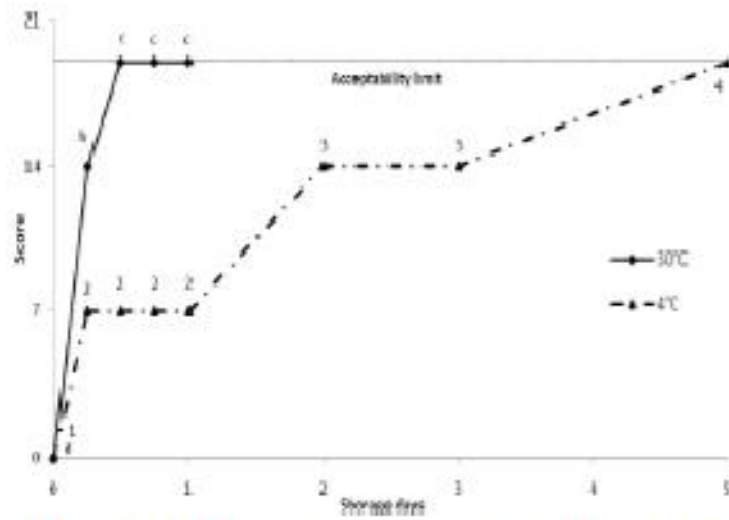


Figure 1. The sensory evaluation of tilapia (*O. niloticus*) stored at 30 and 4°C, mean \pm SD (n = 3). Different letters/numbers on the same curve indicate a statistically significant difference (Tukey test, $p < 0.05$). The dotted line corresponds to the acceptability limit.

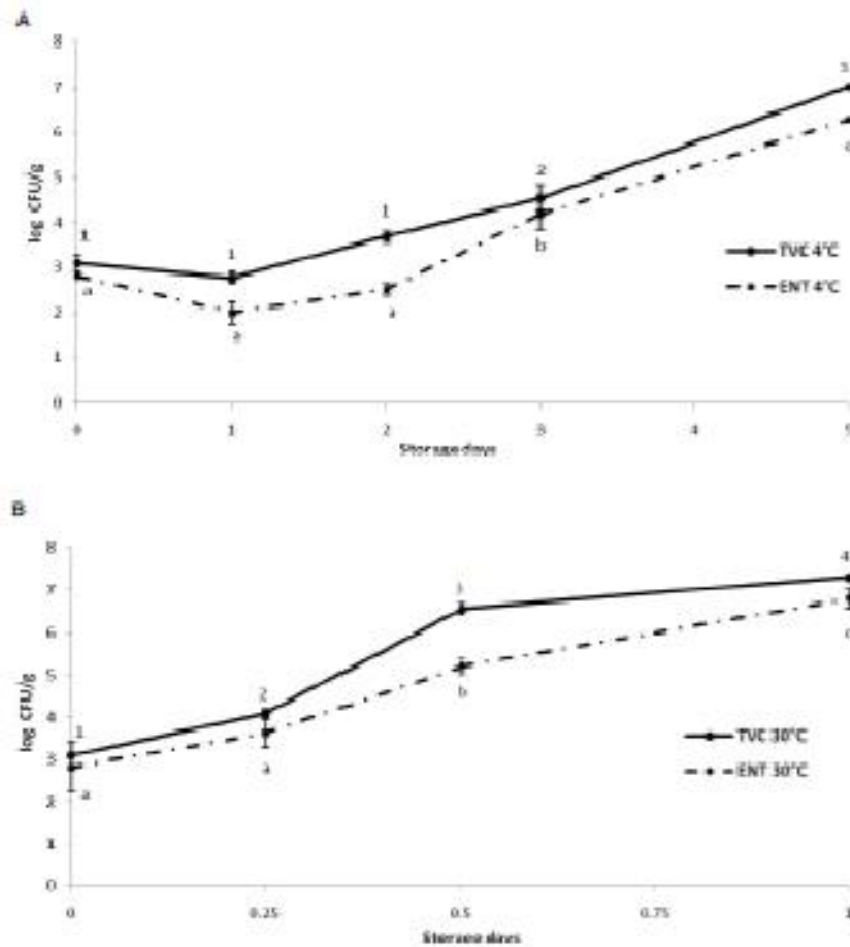


Figure 2. Changes in total viable counts (TVC) and Enterobacteriaceae (ENT) of tilapia (*O. niloticus*) stored at 4 (2A) and 30°C (2B), mean \pm SD (n = 3). Different letters/numbers on the same curve indicate a statistically significant difference (Tukey test, $p < 0.05$).

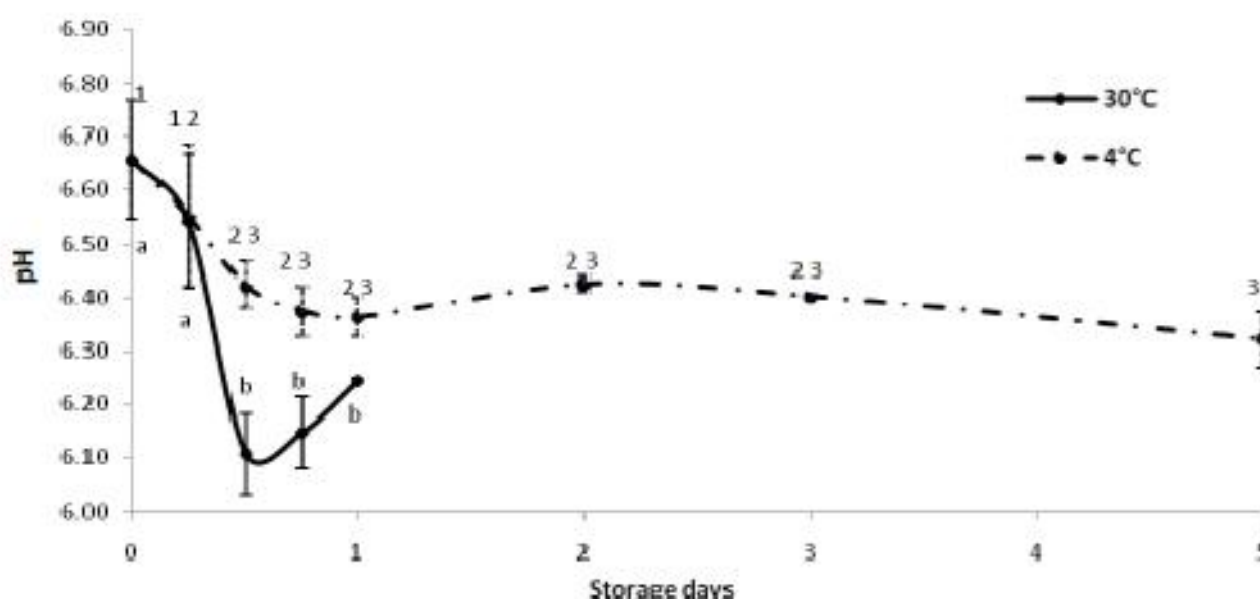


Figure 3. Changes in pH value of tilapia (*O. niloticus*) stored at 30 and 4°C, mean \pm SD (n = 3). Different letters/numbers on the same curve indicate a statistically significant difference (Tukey test, $p < 0.05$).

puffer fish (*Takifugu obscurus*) and Mexis et al. (2009) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) filets. A larger delay was allowed for others species: 7 days for hake (*Merluccius merluccius*) described by Pastoriza et al. (2008) and for lingcod (*Ophiodon elongatus*) reported by Duan et al. (2010).

Chemical assessment

The initial pH value of 6.66 ± 0.11 decreased slightly ($p < 0.05$) to 6.42 ± 0.05 at 4°C and to 6.11 ± 0.07 at 30°C, then remained statistically unchanged throughout the period of conservation in both storage conditions (Figure 3). Post mortem pH has been reported to vary from 6.0 to 7.1, depending on season, species and other factors (Ozogul et al., 2006). In addition, fish muscle tissue contains only very few amounts of glycogen which limit the degree of post mortem acidification of the tissue; hence the pH remained between 6.2-6.5 as compared to average values of the bovine meat (pH 5.5) (Jezek and Buchova, 2012).

TVB-N concentrations of tilapia stored at 4 and 30°C are presented in Figure 4A. The TMA-N values of both storage conditions are illustrated in Figure 4B. The increase in TVB-N is explained by the increased levels of its major constituents (ammonia, DMA and TMA) in the rotting tilapia. Ammonia is usually formed by bacterial deamination of amino acids as well as generated by the autolytic breakdown of adenosine monophosphate (AMP) (Shakila et al., 2003). The DMA is generated by autolysis or by the enzymatic demethylation of TMAO or TMA into

DMA and formaldehyde (Barrett, 1985). Critical limits of 30-35 mg TVB-N 100 g^{-1} of fish flesh were established for different groups of fish species (European Commission, 2004) and a range limit of 10-15 mg TMA-N 100 g^{-1} of flesh according to fish species was recommended by Connell (1985). Our results showed that the amount of TVB-N and TMA-N increased linearly with time regardless of the storage mode. At the beginning of storage, the TVB-N value was $8.12 \pm 0.48 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ of flesh. This value showed gradual increase during the early stages of storage. The level increased rapidly and significantly ($p < 0.05$) to reach $35.84 \pm 0.56 \text{ mg TVB-N } 100 \text{ g}^{-1}$ after 12 h at 30°C and to $37.89 \pm 0.43 \text{ mg TVB-N } 100 \text{ g}^{-1}$ after 5 days at 4°C (Figure 4A).

Tilapia freshly sampled presented a very low content of TMA-N ($0.65 \pm 0.16 \text{ mg TMA-N } 100 \text{ g}^{-1}$). Then, increased significantly ($p < 0.05$) and reached $8.49 \pm 0.43 \text{ mg TMA-N } 100 \text{ g}^{-1}$ after 12 h at 30°C and $15.96 \pm 0.28 \text{ mg TMA-N } 100 \text{ g}^{-1}$ after 5 days at 4°C (Figure 4B). The trend of TMA production during storage depends on the growth of spoiling bacteria. Spoiling bacteria make use of TMAO as an electron acceptor by reducing it to TMA in anaerobic conditions and generate particular ammonia-like and "fishy" off-flavors (Seibel and Walsh, 2002). Our results, at ambient temperature, agree with those of Aina et al. (2010) for TMA-N value and with those of Adoga et al. (2010) for TVB-N values for tilapia sp. The acceptance threshold value of TVB-N and TMA-N is exceeded after 12 h at 30°C. The chilling conservation generally maintains the acceptability of fish within during 5 days and even more, as shown by Marrone et al. (2008) and Baixas-Nogueras et al. (2007) who reported 8 days for

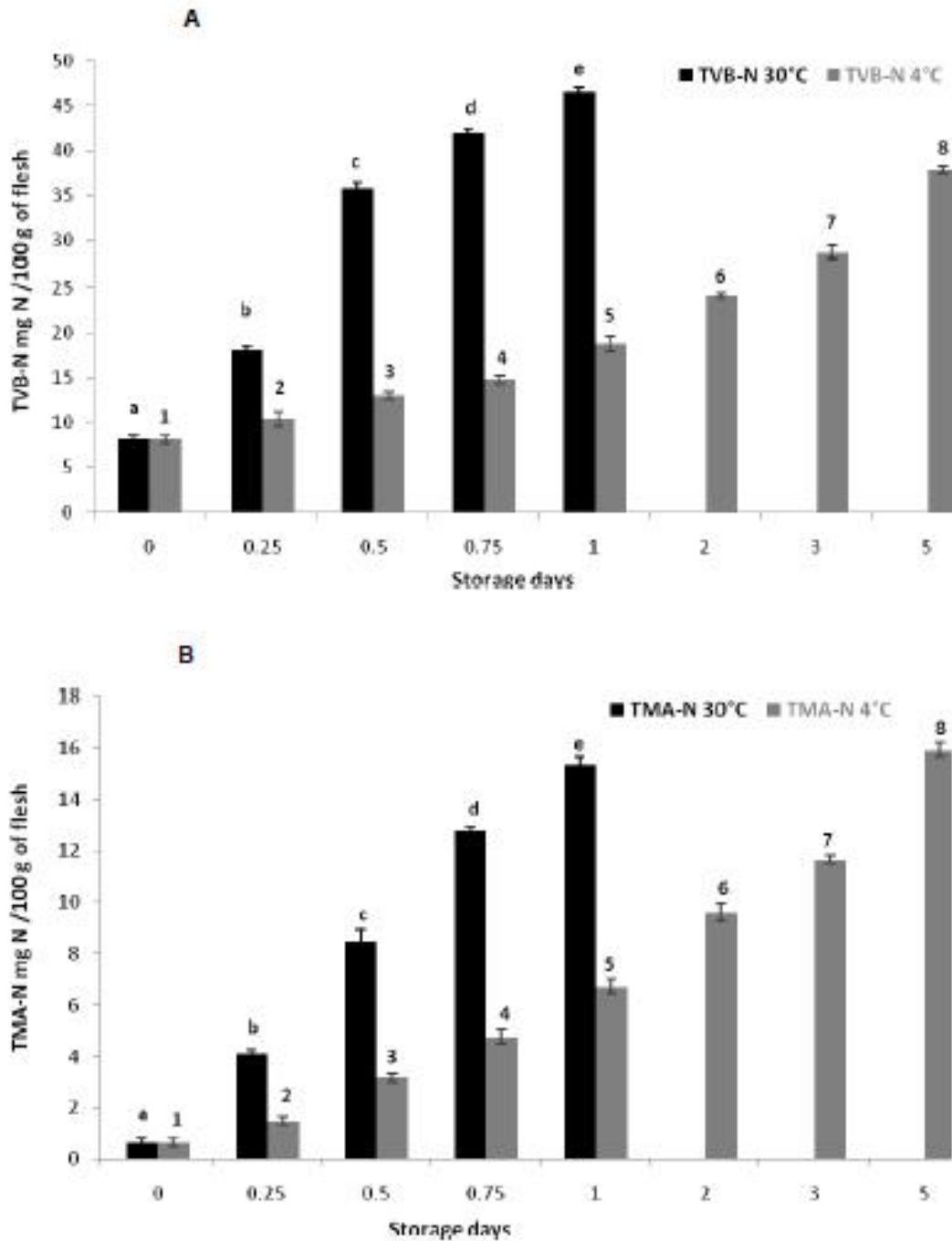


Figure 4. Changes in TVB-N (4A) and TMA-N (4B) in tilapia (*O. niloticus*) stored at 4 and 30°C, mean \pm SD (n = 3). Different letters/numbers on the same pillars indicate a statistically significant difference (Tukey test, $p < 0.05$).

refrigerated hake (*Merluccius merluccius*). These results corroborate those of sensory and bacterial assessment in which tilapia freshness was limited to 12 h and five days for ambient and refrigerated storage, respectively. Pearson's Chi-square test revealed a high correlation between these four parameters and the Rho value was superior to 0.82 (data not shown). We concluded that

TVB-N is a good index of tilapia freshness and TMA-N is a good spoilage index in the present study.

Levels of primary (hydroperoxides) and secondary products (TBARS) of lipid peroxidation in tilapia flesh evolved in the same way for both preservation modes (Figure 5A and B). TBARS kinetics is inversely proportional to hydroperoxides kinetics. The hydroperoxides

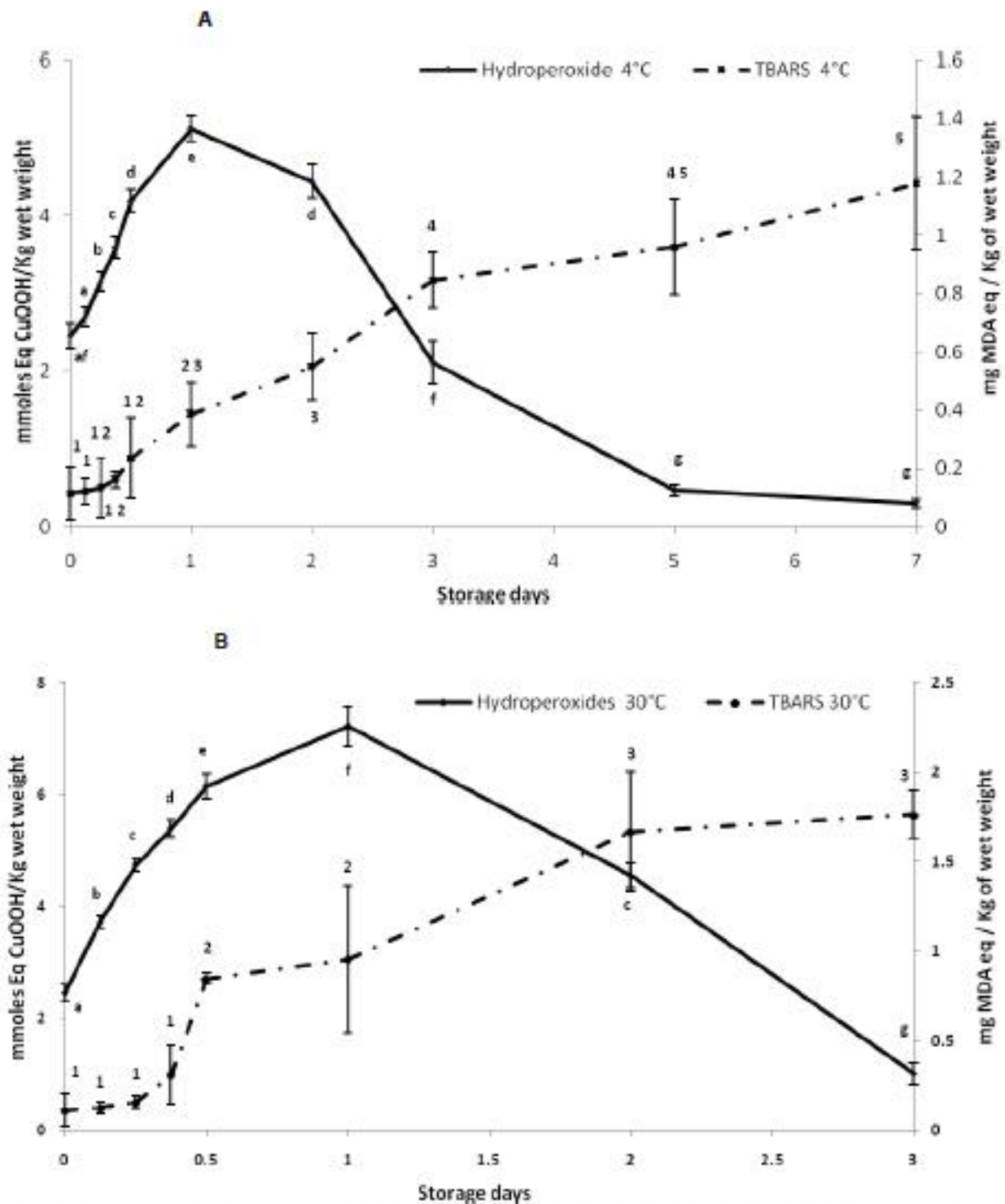


Figure 5. Changes of concentrations in hydroperoxides and TBARS, expressed per kg of wet weight, for samples of tilapia (*O. niloticus*) stored at 4°C (5A) and 30°C (5B), mean \pm SD (n = 5). Different letters/numbers in the same curve indicate a statistically significant difference (Tukey test, $p < 0.05$).

values increased significantly ($p < 0.05$) from an initial level of 2.46 ± 0.16 mmole Eq CuOOH. kg^{-1} to a peak of 5.12 ± 0.17 mmole Eq CuOOH. kg^{-1} and 7.22 ± 0.35 mmole Eq

CuOOH. kg^{-1} after 24 h of storage at 4°C (Figure 5A) and 30°C (Figure 5B), respectively. Then concentrations declined rapidly. This can be explained by the classic

propagation phase of peroxidation process (Azhar and Nisa, 2006). Similar observation was also reported by Oucif et al. (2012) at the second day of storage of Atlantic mackerel (*S. scombrus*) using the same storage modes and analytical method. In parallel, the TBARS values remained low during the first stage of conservation, the concentrations were below 0.5 mg MDA kg⁻¹, earlier linearly ($p < 0.05$), and increased after 12 h at ambient temperature (Figure 5B) and after the 3rd day of storage at 4°C (Figure 5A).

A threshold value of 1 mg MDA kg⁻¹ is usually accepted for the rancidity of meat (Rahardjo and Sofos, 1993). In our study and for Nile tilapia, we proposed a threshold value of 0.85 mg MDA kg⁻¹ for the conservation at ambient temperature, corresponding to a value at which fish was rejected by the sensory control. The TBARS values can be a good index of tilapia freshness for both storage modes. Previous studies on Nile tilapia agree well with our findings especially for TBARS data (Bakar and Izzah, 1995; Adoga et al., 2010; Yampakdee et al., 2012).

Conclusion

Results of sensory, microbial (TVC), TBARS, TVB-N and TMA-N assessment are good criteria to study tilapia (*O. niloticus*) shelf life. There is a linear relationship between spoilage rate, peroxidation, storage time and storage temperatures. For consumers, we recommend a conservation of whole tilapia less than 12 h at ambient temperature and less than 5 days under refrigerated storage to avoid any food intoxication. Other simple method can be added such as biogenic amines assessment to corroborate these findings. The legislation and veterinary inspection services can extrapolate and translate these results to better regulate fish sales in local markets. The Algerian authorities must impose the display of fish under ice in the markets and the consumer must be sensitized on the importance of the maintenance of the cold chain for this fragile foodstuff as well.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge the contributions made by Dr. Charles Melard by providing tilapia fishes during the tests. The authors are grateful to the Averroes organization (3rd program) for the granting of the doctoral award.

REFERENCES

Adoga U, Joseph E, Samuel OF (2010). Storage life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in ice and ambient temperature. *Researcher*. 2:39-44.
Alna VO, Hauwa HMS, Zakari A (2010). Comparative determination of trimethylamine in fresh fish (halibut, mudfish and tilapia). *Cont. J. Fish. Aquat. Sci.* 4:44-46.

Azhar KF, Nisa K (2006). Lipids and their oxidation in seafood. *Jour. Chem. Soc. Pak.* 28:298-305.
Bakas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC (2007). Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing. *Eur. Food Res. Technol.* 226:287-293.
Bakas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués T, Nunes ML, Vidal-Carou MC (2003). Development of a quality index method to evaluate freshness in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *J. Food Sci.* 68:1067-1071.
Bakar J, Izzah AN (1995). Sensory, biochemical and microbiological changes of farmed catfish (*Catlas batrachus*, Linnaeus) and red tilapia (*Oreochromis sp.*) at ambient storage. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 18:215-220.
Barrett EL (1985). Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:131-149.
Boari CA, Pereira GI, Valeriano C, Silva BC, De Moraes VM, Figueiredo HCP, Piccoli RH (2008). Bacterial ecology of tilapia fresh filets and some factors that can influence their microbial quality. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28:863-867.
Bostoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatelis AG (1994). Rapid sensitive and specific thio-barbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.* 42:1931-1937.
Connell JJ (1995). Control of fish quality. 4th edn. London: Fishing News Books.
De Souza NE, Matsushita M, De Oliveira CC, Franco MRB, Visentainer JV (2007). Manipulation of fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) filets with flaxseed oil. *J. Sci. Food Agric.* 87:1677-1681.
Dhanapal KG, Reddy VS, Naik BB, Venkateswarlu G, Reddy AD, Basu S (2012). Effect of cooking on physical, biochemical, bacteriological characteristics and fatty acid profile of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) fish steaks. *Arch. Appl. Sci. Res.* 4:1142-1149.
Duan J, Cherian G, Zhao Y (2010). Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongatus*) filets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chem.* 119:524-532.
Elagba HAM, Al-Sabah GN (2011). Fatty acids content and profile of common commercial Nile fishes in Sudan. *Int. J. Fish. Aquaculture.* 3:99-104.
European Commission (2004). Commission regulation 2074/2005 of 5 december 2005 laying down implementing measures for certain products under regulation (EC) N° 853/2004 of the European parliament and of the council and for the organisation of official controls under regulation (EC) N° 854/2004 of the European parliament and of the council and regulation (EC) N° 882/2004 of the European parliament and of the council, derogating from regulation (EC) N° 852/2004 of the European parliament and of the council and amending regulations (EC) N° 853/2004 and (EC) N° 854/2004. *Off. J. Eur. Union. L* 338:27-59.
Eymard S, and Genot C (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105:497-501.
FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. Rome. p. 209.
Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
Genot C (1996). Some factors influencing TBA test. Annual report of the 5th PCRD EU project: Dietary treatment and oxidative stability of muscle and meat products: nutritive value, sensory quality and safety (Diet-ox). *AIR III-CT-92-1577*.
Gram L, Dalgaard P (2002). Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:262-266.
Gram L, Huss HH (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33:121-137.
Huss HH (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO fisheries technical paper N°. 348, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy.

- ICMSF (1986). International commission on microbiological specifications for foods. sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF (2nd ed.), Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications, vol. 2. University of Toronto Press: Toronto, Canada.
- ISO 936 (1998). Meat and meat products. Determination of total ash. International standard, 2nd ed. Available at http://www.iso.org/iso/publication_item.htm?pid=PUB100042.
- ISO 937 (1978). Meat and meat products. Determination of nitrogen content -reference method. International standard, 1st ed.
- ISO 1442 (1997). Meat and meat products. Determination of moisture content -reference method. International standard, 2nd ed.
- ISO 1444 (1996). Meat and meat products. Determination of free fat content. International standard, 2nd ed.
- ISO 2917 (1999). Meat and meat products. Measurement of pH - reference method. International standard, 2nd ed.
- ISO 4833 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms -Colony-count at 30 degrees C by the pour plate technique. International standard, 3rd ed.
- ISO 21528-1 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment. International standard, 1st ed.
- ISO 21807 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Determination of water activity. International standard, 1st ed.
- Jezek F, Buchova H (2012). Shelf-life of freeze-thawed filets of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* V.) packed under air. *Acta Agr. Slov.* 3:275-279.
- Malle P, Tao SH (1987). Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *J. Food Pro.* 50:756-760.
- Marrone R, Vollano L, Chilrolo C, Palma G, Mercogliano R (2009). Shelf life of different fish species stored with passive refrigeration (PRS). *Vet. Res. Commun.* 33:241-243.
- Mexis SF, Chouliara E, Kontominas MG (2009). Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout filets stored at 4°C. *Food Microbiol.* 26:598-605.
- Navarro RD, Navarro FKSP, Filho OPR, Ferreira WM, Pereira MM, Filho JTS (2012). Quality of polyunsaturated fatty acids in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with vitamin E supplementation. *Food Chem.* 134:215-218.
- Nizeki N, Daikoku T, Hirata T, El-Shourbagy I, Song X, Sakaguchi M (2003). Mechanism of biosynthesis of trimethylamine oxide in tilapia reared under seawater conditions. *Fisheries Sci.* 69:74-87.
- Oucif H, Ali-Mehidi S, Abi-Ayad S-MEA (2012). Lipid oxidation and histamine production in Atlantic mackerel (*Scorpaenidae*) versus time and mode of conservation. *J. Life Sci.* 6:713-720.
- Ozogul Y, Boga KE, Tokur B, Ozogul F (2011). Changes in biochemical, sensory and microbiological quality indices of common sole (*Solea solea*) from the Mediterranean sea, during ice storage. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 11:243-251.
- Ozogul Y, Ozogul F, Kuley E, Ozkutuk S, Gokbulut C, Kose S (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black sea, during chilled storage. *Food Chem.* 99:752-758.
- Ozogul Y, Ozyurt G, Ozogul F, Kuley E, Polat A (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chem.* 92:745-751.
- Pastortza L, Bernardez M, Sampedro G, Calbo ML, and Herrera JJR (2008). Use of sterile and ozonized water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish. *Food Control.* 19:772-780.
- Rahardjo S, Sofos JN (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Sci.* 35:145-169.
- Rezaei M, Hosseini SF (2008). Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *J. Food Sci.* 73:93-96.
- Selbel BA, Walsh PJ (2002). Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *J. Exp. Biol.* 205:297-306.
- Shakila RJ, Vijayalakshmi K, Jeyasekaran G (2003). Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem.* 82:347-352.
- Suloma A, Ogata HY, Garbay ES, Chavez DiR, El-Haroun ER (2008). Fatty acid composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* muscles: a comparative study with commercially important tropical freshwater fish in Philippines. 8th Int. Symp. Tilapia Aquaculture. 921-932.
- Tuckey NPL, Forgan LG, Jerrett AR (2012). Fillet colour correlates with biochemical status in Australasian snapper (*Pagrus auratus*) during storage in refrigerated seawater. *Aquaculture.* 356:256-263.
- Yampakdee S, Benjakul S, Nalinanon S, Kristinsson HG (2012). Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chem.* 132:1781-1788.
- Zhou R, Liu Y, Xie J, Wang X (2011). Effects of combined treatment of electrolysed water and chitosan on the quality attributes and myofibril degradation in farmed obscure puffer fish (*Takifugu obscurus*) during refrigerated storage. *Food Chem.* 129:1660-1666.

ANNEXE II

Annexe II : Composition des milieux de culture utilisés dans les études microbiologiques.

La composition donnée est pour un volume final d'un litre et l'autoclavage se fait à 121°C pendant 20 minutes.

Milieu PCA

Peptone	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
pH = 7	

Milieu BCPL

Peptone	5,0 g
Extrait de viande de bœuf	3,0 g
Lactose	10,0 g
Pourpre de bromocrésol	25,0 mg
pH = 6,8	

Milieu Schubert

Tryptone	12,0 g
Tryptophane	1,0 g
Mannitol	9,0 g
Bile de boeuf déshydratée	25,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate monopotassique	1,5 g
Phosphate di-potassique	3,5 g
Lauryl-sulfate de sodium	0,2 g
pH = 7	

Milieu Rothe S/C

Peptone	20,0 g
Glucose	5,0 g
Azide	0,2 g
NaCl	5,0 g
Hydrogénophosphate de potassium	2,7 g
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7 g
pH = 6,8	

ANNEXE II

Milieu Eva- Litzky

Peptone	20,0 g
Glucose	5,0 g
Azide	0,2 g
Ethyl-violet	0,5 g
NaCl	5,0 g
Hydrogénophosphate de potassium	2,7 g
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7 g
pH= 6,8	

Milieu gélose viande-foie

Base viande foie	30,0 g
Glucose	2,0 g
Agar	6,0 g
pH = 7,4	

Milieu Chapman

Peptone	10,0 g
Extrait de viande de bœuf	1,0 g
Chlorure de sodium	75,0 g
Mannitol	10,0 g
Rouge de phenol	0,025 g
Agar-Agar	15,0 g
pH = 7,4	

Milieu bouillon sélénite

Tryptone	5,0 g
Lactose	4,0 g
Sélénite	4,0 g
Hydrogénosélénite de sodium	4,0 g
pH=7	

ANNEXE II

Milieu Salmonelle-Shigelle

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Lactose	10,0 g
Citrate de sodium	10,0 g
Citrate de fer III	1,0 g
Sels biliaires	8,5 g
Vert brillant	3,3 mg
Rouge neuter	25,0 mg
Thiosulfate de sodium	8,5 g
Agar	12,0 g

pH = 7,3 (il faut dissoudre ce milieu par ébullition et ne pas par autoclavage)

Milieu King A

Peptone dite	20,0 g
Glycérol	10,0 g
Sulfate de potassium	10,0 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Agar purifié	12,0 g

pH = 7,2

Milieu King B

Peptone	20,0 g
Glycérol	10,0 g
Hydrogénophosphate de potassium	1,5 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1,5 g
Agar	12,0 g

pH = 7,2

Gélose nutritive

Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g

pH = 7,0