

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

«Bioprocédés, Hygiène & sécurité alimentaires»

**Etude de La qualité bactériologique des Mollusques
bivalves issus de la zone côtière Ras El ma-Saïdia**

Présenté par :

Mlle. LOUZARI Meryem

Encadré par :

Pr. ANANOU Samir

Mr. LAYACHI Mostafa

Soutenu le : 11 /06/2019

Devant le jury composé de :

➤ Pr. ANANOU Samir

FST, Fès

➤ Pr. BELRHITI ALAOUI Aziz

FST, Fès

Année universitaire
2018/2019

Dédicace

Je dédie ce travail à

*Mes parents, qu'ils trouvent dans ce modeste travail l'expression de ma
profonde reconnaissance pour leurs sacrifices, leurs encouragements et
leurs amours.*

*Mon frère et Ma sœur pour leur soutien moral, leurs aides, leur
encouragement et leurs belles surprises sucrées.*

*Mon beau-frère ; un remerciement particulier et sincère pour tous vos
efforts fournis. Que le dieu vous apporte bonheur et satisfaction.*

*A toute ma famille et mes amies, ou collaboré à la réalisation de ce
travail, en guise de reconnaissance.*

Remerciements

Mes vifs remerciements et ma reconnaissance à mon encadrant professeur **ANANOU Samir** de la faculté des Science et Technique de Fès, qui a permis de bénéficier de son encadrement, les conseils qu'il m'a prodigué, et son aide précieuse, je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'il a porté à ce travail.

Mes vifs remerciements vont aussi à Pr. **BELRHITI ALAOUI Aziz** qui a accepté de sacrifier une partie de son temps pour juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements et gratitude à :

Mr **ELOUAMARI Najib** chef de Centre Régional de l'Institut National de Recherche Halieutique de Nador.

Professeur **AARAB Lotfi** chef de filière « Bioprocédé, Hygiène et Sécurité Alimentaire ».

Je tiens à remercier très vivement et respectueusement, à l'égard de mon encadrant de stage le docteur **LAYACHI Mostafa** chef de « Laboratoire de Surveillance et de Suivi du Milieu Marin » du Centre Régional de Nador, pour son accueil et le partage de son expertise au quotidien et ses connaissances de manière très pédagogique, grâce aussi à sa confiance j'ai pu m'accomplir totalement dans mes missions. Il fut d'une aide précieuse dans les moments les plus délicats.

Je souhaite également à remercier très particulièrement et solennellement tous le personnel du Centre Régionale de L'INRH de Nador, notamment du laboratoire de microbiologie Monsieur **AZZAOUI Yahya**, Monsieur **EL MADANI Faïd** responsable de l'unité phytoplancton toxique et Monsieur **CHAFIQ Lahcen** responsable de l'unité biotoxine marine pour leurs aide permanent et aussi pour leurs précieux conseils .

Que tous ceux qui ont fait part, de près ou de loin à ce travail trouvent ici l'expression de mes remerciements et ma profonde gratitude.

Liste d'abréviation

INRH : Institut National de Recherche Halieutique.

LSSMM : Laboratoire de Surveillance et Suivi du Milieu Marin.

IPM : Institut de pêche Maritime.

ISPM : Institut Scientifique des Pêches Maritimes.

ONP : Office National des Pêches.

LSSMM : Laboratoire de Surveillance et Suivi du Milieu Marin.

LSP: Lipophilic shellfish poison.

PSP: Paralytic shellfish poison.

ASP: Amnesic shellfish poison.

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

TIA : Toxi-infection Alimentaire.

TIAC : Toxi-infection Alimentaire Collective.

SSL : Surveillance de la Salubrité du Littoral.

C.L.I : Chair et le liquide intervalvaire.

NPP : Nombre Plus Probable.

TBX : Tryptone Bile X Glucuronide.

E. coli : *Escherichia coli*.

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Principaux composants d'un filet de poisson en pourcentage (%) [Stansby (1962)].	10
<u>Tableau 2</u> : Estimation de la qualité microbiologique des zones de production de mollusques bivalves en fonction des seuils de contamination fixés par la circulaire n°15/08/12.	15
<u>Tableau 3</u> : Evaluation du niveau moyen de contamination chimique des zones de production de mollusques bivalves en fonction des seuils de contamination fixés par la circulaire n°15/08/12.	15
<u>Tableau 4</u> : Niveaux de la contamination par <i>E. coli</i> β -glucuronidase positive de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> prélevée de la région de Saïdia.	22
<u>Tableau 5</u> : Niveaux de la contamination par <i>E.coli</i> β -glucuronidase positive de la petite praire (<i>Chamelea gallina</i>) prélevée de la région de Ras El Ma.	23

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Implantation des centres de l'INRH au Maroc.	3
<u>Figure 2</u> : Organisation interne de l'Institut Nationale de Recherche Halieutique.	4
<u>Figure 3</u> : Organigramme du CR de l'INRH-Nador.	6
<u>Figure 4</u> : Arbre phylogénique des mollusques bivalves [Kocot et al.2011].	11
<u>Figure 5</u> : Morphologie d'un mollusque bivalve.....	12
<u>Figure 6</u> : Localisation géographique des points de prélèvement de site d'étude du littoral de Ras EL Ma-Saiidia [LAYACHI et al, 2014].	17

Sommaire

Introduction.....	1
Présentation de la structure d'accueil.....	2
A/ Historique.....	3
B/ Mission de l'INRH	3
C/ Structure du L'INRH	4
Centre régional de l'INRH à Nador	5
A/ Missions du centre régional de l'INRH à Nador	5
B/ Objectifs du centre régional de l'INRH à Nador	5
1) Laboratoires des pêche	6
2) Laboratoires de Surveillance et Suivi du Milieu Marin (LSSMM)	7
2.1 Unité de Phytoplancton	7
2.2 Unité de biotoxines marine	8
2.3 Unité de microbiologie	8
Synthèse Bibliographique	9
I. Caractéristiques des produits de la pêche	10
II. Généralités sur les mollusques bivalves	10
1) Définition, anatomie et classification des mollusques bivalves	10
1.1 Définition.....	10
1.2 Classification.....	11
1.3 Anatomie	12
2) Contamination des mollusques bivalves.....	13
III. Contexte réglementaire de la qualité microbiologique des mollusques bivalves au Maroc	13
1) Contexte réglementaire	13
2) Stratégie de surveillance de la salubrité du littoral (SSL)	14
MATERIEL ET METHODES	16
I. Présentation du site d'étude	17
II. Matériel biologique.....	18
III. Examen bactériologique des mollusques bivalves	18
IV. Analyses microbiologiques.....	19
RESULTATS ET DISCUSSION	21
Conclusion générale.....	24
Références bibliographiques	25
Références webographiques.....	26
Annexes	27

Introduction

Le Maroc dispose d'atouts indéniables en ce qui concerne les ressources halieutiques. En effet, le pays a une longueur totale de côte importante (3500 km), situé sur les rivages atlantique (2934 km de Tanger à Laguiria) et méditerranéenne (de Tanger à Saïdia 512 km). [El Hamzaoui, 2011]. Il bénéficie des caractéristiques hydro-climatiques très favorables, telles que les vents alizés et les remontées des eaux froides profondes riches en nutriments. Ces conditions rendent le Maroc l'un des plus importants producteurs et exporteurs des produits de la mer dans le monde Arabe et en Afrique. [El Hamzaoui, 2011].

Les produits de la mer sont constitués de différents types de poissons et d'autres produits tels que les céphalopodes, crustacés, mollusque algues maritimes, produits de l'aquaculture... Ainsi, ces produits peuvent être commercialisés sous plusieurs formes, à savoir à l'état frais ou transformés.

Par ailleurs, l'activité de la pêche est exercée à partir des ports de l'atlantique, à savoir par ordre d'importance : Agadir, Casablanca, Laâyoune, Tan-Tan, Dakhla. Aussi, des ports de la méditerranée tels que Nador, Al Hoceima et M'diq. [Veille technologique en agroalimentaire. Les produits de la mer au Maroc.<http://eilleagro.imist.ma/index.php/produit-et-machinisme/ingredients-et-nutrition/533-les-produits-de-la-mer-au-Maroc>].

De point de vue sanitaire, au Maroc, 7118 cas de toxi-infections alimentaires ont été rapportés entre 2000 et 2004, dont plus de 86% sont d'origine bactérienne. [COHEN, 2006]. Les produits de la pêche contaminés sont responsables de 10% des cas de TIAC déclarés au Maroc [ANONYMOUS.Morroco Food borne disease out breaks2000-2005].

Cependant, la contamination des produits de mer (Mollusque bivalve, poissons, céphalopodes..) nécessite la surveillance et l'analyse des éléments toxiques pouvant présenter un danger potentiel. De nombreuses études ont été réalisées dans ce domaine. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, dont l'objectif principal est l'étude de la qualité bactériologique des produits de pêche, surtout les mollusques bivalves, issus du littoral méditerranéenne EST du Maroc. Cette étude est menée en appliquant la méthodologie de la surveillance sanitaire des zones conchylicoles suivi par le laboratoire de Surveillance et Suivi du Milieu Marin de l'INRH de Nador.

Présentation de la structure d'accueil



A/ Historique :

La création de l'Institut National de Recherche Halieutique (INRH) a été commencée au départ par l'instauration de l'Institut de Pêche Maritime sous le protectorat de la république française au Maroc en 1946, après en **1969**, l'IPM est rattaché à l'Office National des Pêches (ONP) nouvellement créé et prie le nom d'Institut Scientifique des Pêches Maritimes (ISPM).

En 1984, le Ministère des pêches Maritime a soutenu la création d'un véritable Institut, disposant de l'autonomie administrative et financière et apportant l'avis scientifique nécessaire à l'élaboration et la mise en œuvre des plans d'exploitation des pêcheries.

Etant donné l'importance du secteur halieutique sur les plans de développement économique, social et environnementale, et enfin de tenir compte des recommandations émanant des instances internationales auxquelles le Maroc a souscrit, une série de mesures ont été prises par les pouvoirs publics.

Dans ce cadre est proposée la création en 1996 en remplacement de L'ISPM de l'Institut Nationale de Recherche Halieutique (INRH), établissement public à caractère scientifique et technique, doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière.
[\[www.inrh.ma/fr/historique\]](http://www.inrh.ma/fr/historique).



L'INRH dispose actuellement d'une entité centrale à Casablanca et de 5 centres régionaux (Nador, Tanger, Agadir, Laayoune, Dakhla).

[\[www.inrh.ma/fr/publications/rapport-dactivite-2013\]](http://www.inrh.ma/fr/publications/rapport-dactivite-2013).

Figure 1: *Implantation des centres de l'INRH au Maroc.*

B/ Mission de l'INRH :

L'INRH a pour mission d'entreprendre toutes activités de recherche, études, actions expérimentale et travaux en mer ou à terre ayant pour objectifs l'aménagement et la rationalisation de la gestion des ressources halieutiques et aquacoles et leur valorisation.

Les missions qui lui sont confiées se présentent comme suit :

- Evaluation des ressources halieutiques et suivi de leur exploitation.
 - Etude du fonctionnement des écosystèmes marins et littoraux.
 - Surveillance de la qualité et la salubrité du milieu marin.
 - Essais des techniques de pêche et valorisation des produits de la mer.
 - Evaluation des potentialités aquacoles du littoral national et réalisation des recherches, à même de contribuer au développement de l'aquaculture marocaine.
- [www.inrh.ma/fr/publications/rapport-dactivite-2013].

C/ Structure de L'INRH :

La diversité des champs d'action et des domaines de recherche de l'INRH s'appuie, dans un premier lieu sur une organisation centrale basée sur quatre départements scientifiques pour la coordination et la supervision nationale des activités scientifiques :

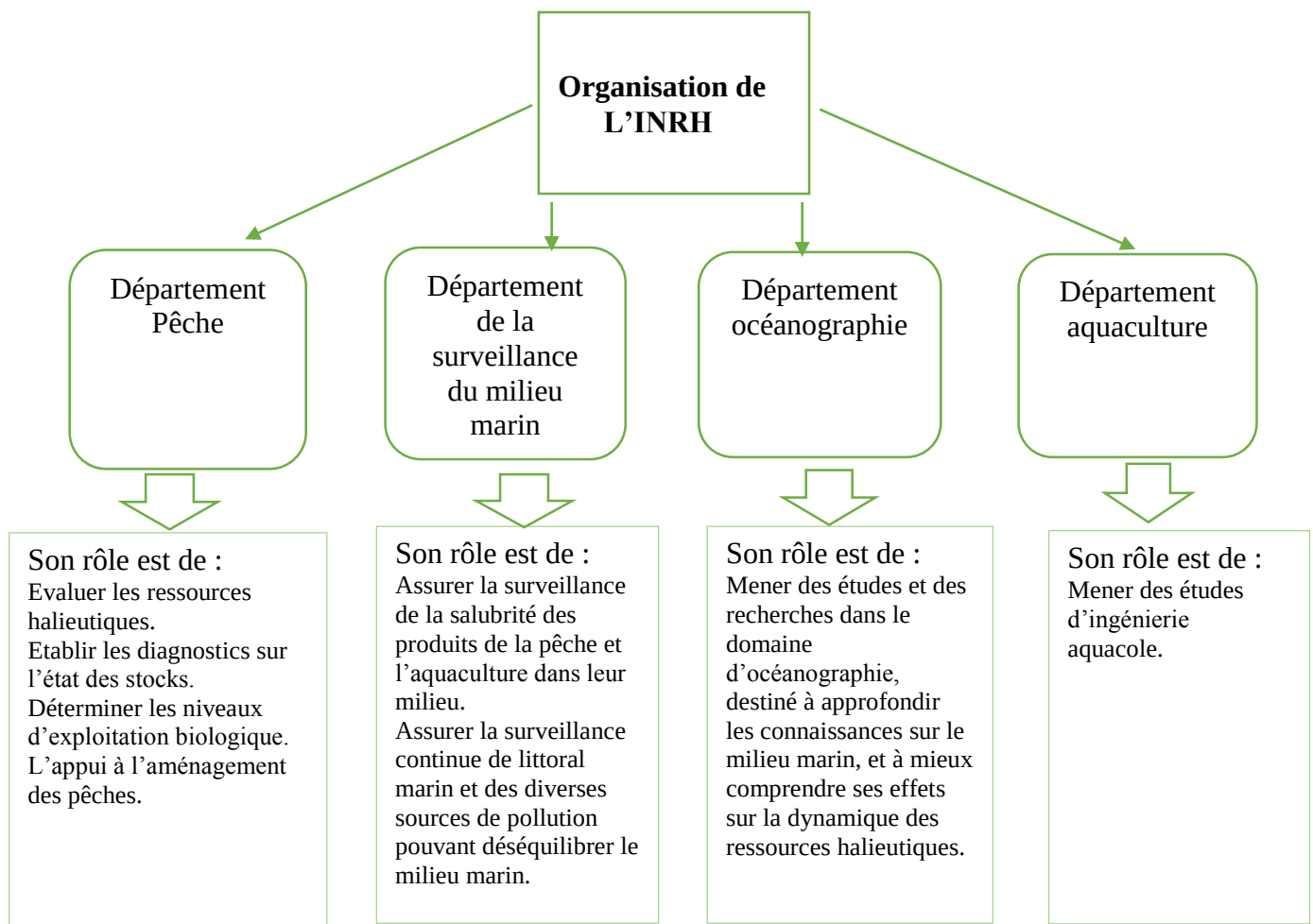


Figure 2 : Organisation interne de l'Institut National de Recherche Halieutique.

Centre régional de l'INRH à Nador

Le centre régional de l'INRH de Nador a été mis en activité en octobre 1998, sa zone de compétence couvre la région maritime de la méditerranée orientale, de Saïdia à Jebha, sur une côté de 250 km, couvrant ainsi :

- 3 ports de pêche : Ras-Kebdana, Nador et Al Hoceima.
- 2 villages de pêche : Cala-IRIS et Sidi Hssain.
- 2 points de débarquement aménagé.

A/ Missions du centre régional de l'INRH à Nador :

1. Étude du fonctionnement des écosystèmes marins et littoraux.
2. Surveillance de la qualité et de la salubrité du milieu marin.
3. Évaluation des ressources halieutiques et suivi de leur exploitation.
4. Essais des techniques de pêche.
5. Évaluation des potentialités aquacoles et contribution au développement de l'aquaculture.
6. Valorisation des produits de la mer. [www.inrh.ma/fr/centre-regional-nador]

B/ Objectifs du centre régional de l'INRH à Nador :

- ✓ Préservation du milieu marin et protection de la santé du consommateur et des produits de la mer.
- ✓ Gestion durable et responsable des ressources.
- ✓ Valorisation des ressources en vue de l'amélioration des revenus de la compétitivité.
- ✓ Vulgarisation et développement de l'aquaculture.

Dans ce sens, on pourrait schématiser l'organisation de l'INRH de Nador selon l'organigramme suivant :

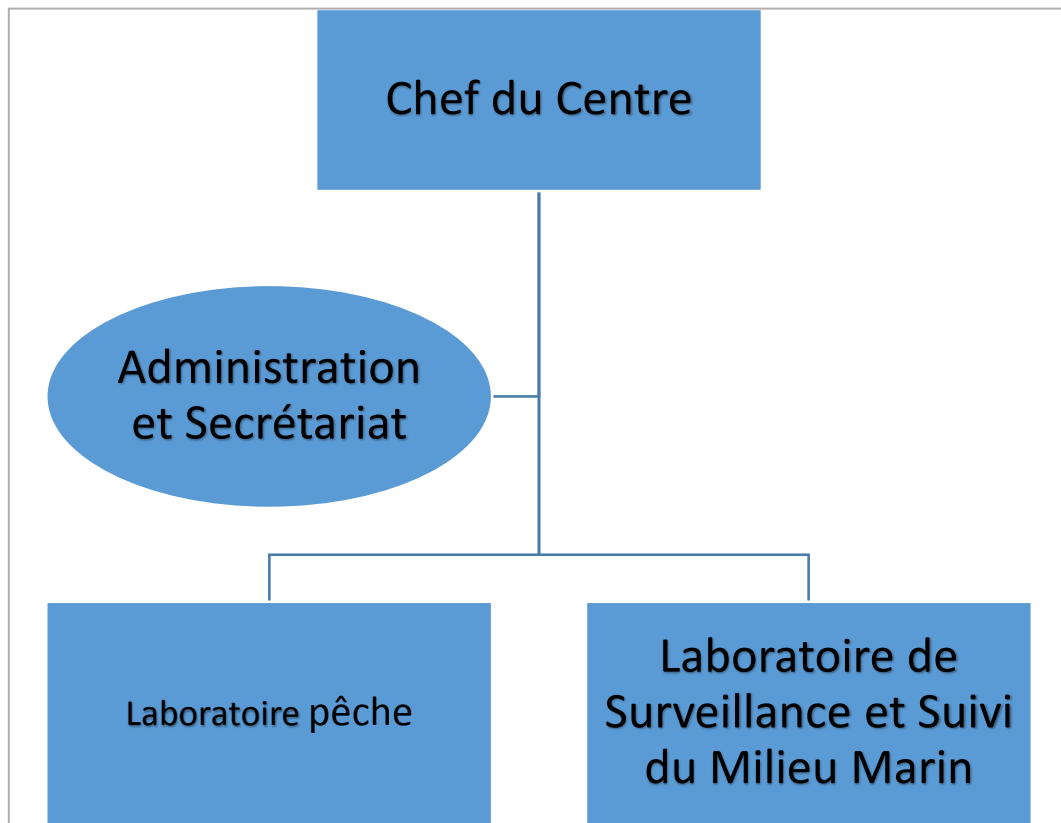


Figure 3 : *organigramme du CR de l'INRH-Nador.*

Selon l'organigramme de l'INRH ci-dessus, les centres régionaux de l'INRH ont un rôle très important dans le suivi des programmes de recherche halieutique au niveau régional. Le centre régional de Nador est organisé en deux laboratoires, chaque laboratoire assure des tâches particulières pour atteindre ses objectifs :

1) Laboratoires des pêche

Ce laboratoire est basé sur les missions suivantes :

- Evaluer les ressources halieutiques.
- Etablir les diagnostics sur l'état des stocks.
- Déterminer leurs niveaux d'exploitation biologique.
- Etudier les facteurs qui régissent leur évolution.

2) Laboratoires de Surveillance et Suivi du Milieu Marin (LSSMM)

Les missions de ce laboratoire sont :

- Etude de zone pour classement sanitaire des zones conchylicoles.
- Surveillance régulière des zones conchylicoles classées.
- Suivi environnemental de lagune Marchica, des embouchures et du Littoral méditerranéen EST.

Le laboratoire de SSMM est constitué par 3 unités de recherche :

2.1 Unité de Phytoplancton :

Où se fait la surveillance et l'identification des espèces phytoplanctoniques, notamment toxigènes dans les zones de la production et d'élevage des mollusques bivalves.

Les phytoplanctons toxiques ou appelés aussi les efflorescences nuisibles sont des algues microscopiques présents partout où il y a de l'eau (les milieux marin côtier, lagunaire...), ils forment le premier maillon de la chaîne alimentaire dans les écosystèmes marins, il y a des espèces phytoplanctoniques qui secrètent des substances toxiques sont les Phycotoxines qui peuvent être nocives pour certains animaux marins.

Il y a des espèces marines comme les coquillages, qui se nourrissent sur les phytoplanctons, ce qui conduit à l'accumulation des toxines, alors ils deviennent potentiellement toxiques pour les consommateurs des produits de la mer.

Alors l'objectif principal de laboratoire de phytoplancton, c'est l'identification et le dénombrement des espèces potentiellement toxiques ou nuisibles, au niveau des zones conchylicoles classées, et déclenchement des pré-alertes en cas de dépassement des valeurs seuils.

2.2 Unité de biotoxine marine :

Les biotoxines marines sont des Phycotoxines produites par des microalgues, qui prolifèrent lorsque les conditions sont favorables, les mollusques bivalves filtreurs accumulent ces toxines après avoir ingérer des algues toxiques qui peuvent être à l'origine de diverses intoxications aiguës provoquant des symptômes dont la gravité dépend de la nature de la toxine, de la dose ingérée et de la sensibilité du consommateur.

Il y a trois grands types de biotoxines marines recherchées présents dans les mollusques bivalves vivants et qui sont réglementés : les toxines lipophiles (LSP), les toxines amnésiantes (ASP) et les toxines paralysantes (PSP).

Au niveau de l'unité de la biotoxine, on ne fait que le prétraitement hebdomadaire des échantillons suivis d'un protocole donné, après ils sont envoyés au laboratoire central de l'INRH à Casablanca pour être analyser.

2.3 Unité de microbiologie :

Sa mission principale consiste à évaluer les niveaux et les tendances de la contamination microbiologique du milieu marin.

Synthèse Bibliographique

I. Caractéristiques des produits de la pêche

Les produits de la pêche constituent un secteur important pour le Maroc. Ils se caractérisent par une très grande diversité d'espèces de coquillages, poissons, crustacés et de céphalopodes. Sont consommées issue de la pêche et de l'aquaculture. Ces produits présentent des qualités très variables. Selon la FAO (Organisation des nations unies pour l'alimentation), la faune aquatique assure de 15% à 20% de toutes les protéines animales de l'alimentation humaine. Le poisson a une haute valeur nutritive et constitue un complément précieux dans les régimes alimentaires.

La composition globale dans la plupart des produits de la pêche majoritairement de l'eau, des lipides et des protéines. Il y a aussi des constituants mineurs comme les glucides, vitamines et les éléments minéraux (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux composants d'un filet de poisson en pourcentage (%) [Stansby .M.E (1962)].

Constituants	Poisson (filet)		
	Minimum	Intervalle normal	Maximum
Protéines	6	16-21	28
Lipides	0,1	0,2-25	67
Hydrates de carbone		<0,5	
Cendres	0,4	1,2-1,5	1,5
Eau	28	66-81	96

II. Généralités sur les mollusques bivalves

1) Définition, anatomie et classification des mollusques bivalves

1.1 Définition

Les Mollusques Bivalves, nommés également les Pélécypodes ou Lamellibranches, comprennent les palourdes, les moules, les huitres, les pétoncles et d'autre familles de coquilles. Ils sont considérés comme des animaux aquatiques invertébrés au corps mou, ou vivant, dans des lieux humides [4]. Ils sont formés d'une coquille à deux valves, plus ou moins symétriques, articulées dorsalement par une charnière taxodonte. Ils sont capables de coloniser les substrats par la fixation sur les rochers ou autres surfaces dures.

Ces animaux respirent grâce à des branchies bien développés et lamellaires (d'où le nom de Lamellibranches). La majorité se nourrit par la capture des substances nutritives en filtrant de l'eau [<https://fr.wikipedia.org/wiki/Bivalvia>].

1.2 Classification

L'embranchement des Mollusques se range entre les Annélides et les Arthropodes (Crustacés - Insectes). On le subdivise en deux Sous Embranchements :

- Les **Aculifères** dépourvus de coquille mais possédant des spicules calcaires. Ce sont des organismes primitifs essentiellement marins.
- les **Conchifères** possédant une coquille calcaire sécrétée par le manteau et un pied locomoteur.

Selon Lalicker et Fischer (1952), la classification des Mollusques bivalves se base sur la structure de la coquille, le type de branchies et la configuration des dents de la charnière [[Pommpuy.M 2005](#)]. La figure suivante montre cette classification :

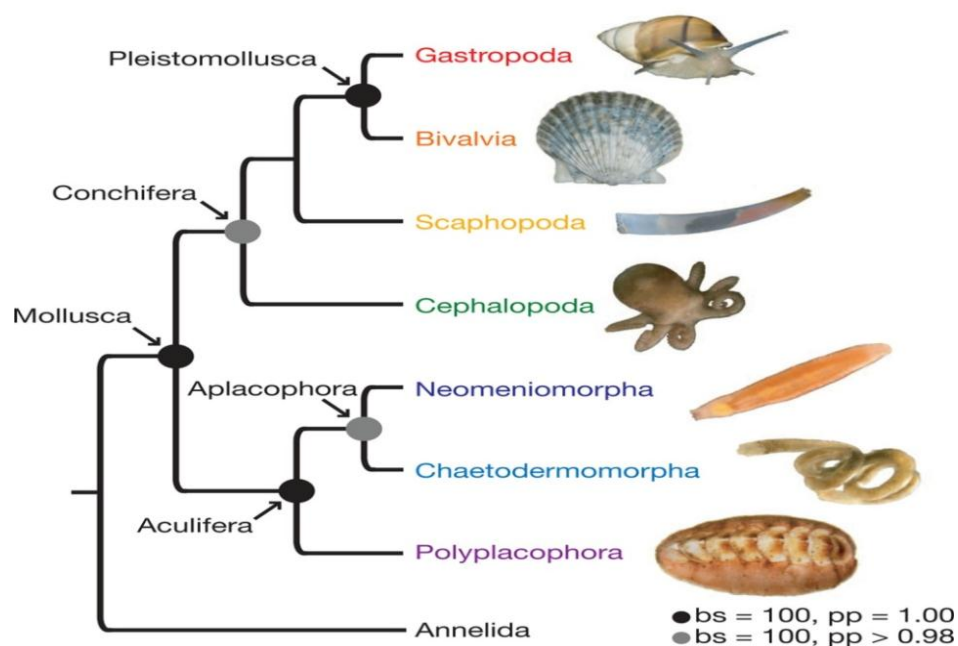


Figure 4 : *Arbre phylogénique des mollusques bivalves* [Kocot et al.2011].

1.3. Anatomie

La plupart des bivalves sont des mollusques filtreurs (Figure 5). La tête se limite à la bouche et ils ne possèdent pas de radula. Ils se nourrissent essentiellement du phytoplancton ou de détritus. L'eau chargée de particules nutritives et en oxygène pénètre par le siphon inhalant. Elle est pompée par le battement des millions de petits cils de branchies. La nourriture triée par les branchies est acheminée vers la bouche puis digérée. Les excréments seront évacués par le siphon exhalant avec l'eau de respiration. Les bivalves possèdent une coquille à deux valves articulés entre elle par une charnière et manœuvrées grâce aux muscles adducteurs, le manteau sécrète la coquille. Le pied très musclé sert l'enfouissement [<https://www.mer-littoral.org/14/bivalves.php>].

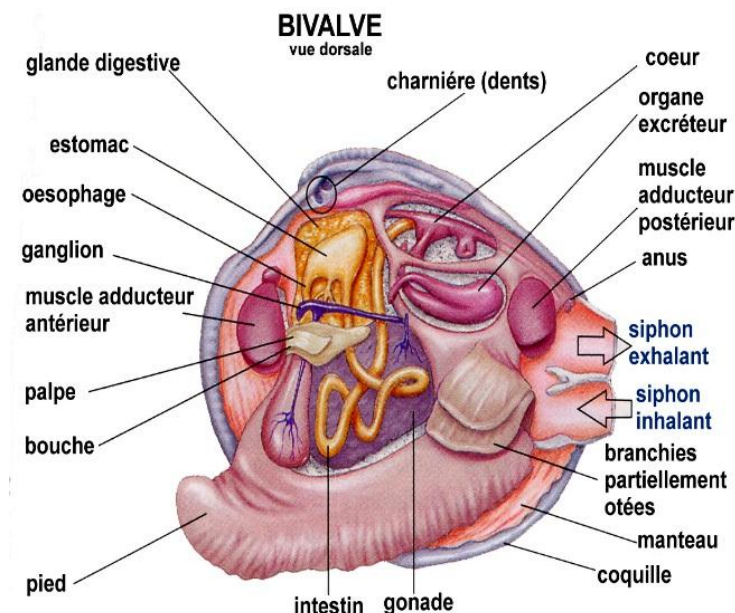


Figure 5 : La morphologie d'un mollusque bivalve.

[<http://plongee.cours.free.fr/bio/images/mollusques/F.69.Bivalve.P.73.JPG>].

2) Contamination des mollusques bivalves

Les mollusques bivalves sont des animaux aquatique dites filtreurs. Ils sont le siège d'une intense circulation d'eau qui apporte l'oxygène et les aliments : phytoplancton, virus, parasites, produit chimique. Ce régime alimentaire conduit à une bioaccumulation des microorganismes (bactérie, virus..) dans l'appareil digestif des mollusques.

De plus, les coquillages ce sont des aliments consommés crus ou peu cuits (moule). Les bio-toxines, les bactéries et les virus, qu'ils contiennent, sont donc mal éliminés. Il en résulte de nombreuses toxi-infections alimentaires collectives chez l'homme dues à l'ingestion de ce type d'aliments [DWAAL, S C 2001].

Les coquillages consommés crus ou peu cuits, peuvent être à l'origine de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) [COKHEN N2006]. Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'apparition d'au moins deux cas similaire d'une symptomatologie, en générale gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire [InVS, 2006].

La contamination des aliments d'origine animale et principalement des produits de la pêche est responsable de 10% des cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) [ANONYMOUS.Morroco Food borne disease out breaks2000-2005].

III. Contexte réglementaire de la qualité microbiologique des mollusques bivalves au Maroc

1) Contexte réglementaire

Le contrôle sanitaire des denrées alimentaires au Maroc est régi par la loi n° 1-75-291 du 8 octobre 1997. Ainsi, plusieurs textes sectoriels concernant les produits d'origine animale, notamment les produits de la pêche. Concernant les mollusques bivalves, une circulaire du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime n° 1508/12 du 15 Août 2012, fixe les conditions de commercialisation et de mise sur le marché de ces produits de la pêche, conformément aux exigences sanitaires requises [<http://www.inrh.ma/fr/publications/bulletin-de-surveillance-sanitaire-des-zones-de-production-conchylicole-ann%C3%A9e-2015>].

La contamination des milieux aquatique par les microorganismes d'origine fécale constitue un risque important pour la santé humaine et une préoccupation pour la pérennité de certains usages tout particulièrement en zones littorale. L'évaluation de la qualité microbiologique des coquillages se fait sur la base du concept d'organismes dits « indicateur ».

On appelle un indicateur bactériologique : une bactérie dont la présence et /ou la quantité à un endroit révèle un problème écologique au sens large [AFNOR.2002]. Dans le cas des mollusques bivalves, on s'intéresse aux indicateurs de la contamination fécale qui sont des

indicateurs de manque d'hygiène. Parmi les microorganismes indicateurs de la contamination fécale on a les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux [Pommpuy.M.2005].

2. Stratégie de surveillance de la salubrité du littoral (SSL)

Les sites utilisés pour l'élevage, ainsi que les bancs naturels de coquillages, sont classés par ordre décroissant de salubrité en 4 catégories A, B, C et D et ce selon l'estimation de la qualité microbiologique et évaluation de la contamination chimique (circulaire 15.08.12 d'Aout 2012) (Tableau 2 et 3) :

- ✓ Les mollusques bivalves vivants provenant d'une zone de production de **classe A** peuvent être mis sur le marché, pour la consommation humaine directe.
- ✓ Les mollusques bivalves vivants provenant d'une zone de production de la **classe B** ne peuvent être mis sur le marché, pour la consommation humaine, qu'après que ceux-ci ont été traités dans un centre de purification agréé ou après reparcage dans une zone autorisée.
- ✓ Les mollusques bivalves vivants provenant d'une zone de production de **classe C** ne peuvent être mis sur le marché, pour la consommation humaine, qu'après reparcage pendant une durée d'au moins deux mois, dans une zone de reparcage autorisée.

Après leur purification ou leur reparcage, les mollusques bivalves vivants provenant de zones de production de classe B ou C doivent satisfaire à toutes les normes sanitaires exigées dans la circulaire 15.08.12. Après classement, les zones cibles font l'objet d'une surveillance sanitaire régulière, destinée à vérifier la pérennité des caractéristiques ayant fondé leur classement et à dépister d'éventuels épisodes de contamination [<http://www.inrh.ma/fr/publications/bulletin-de-surveillance-sanitaire-des-zones-de-production-conchylicole-ann%C3%A9e-2015>].

Tableau 2 : Estimation de la qualité microbiologique des zones de production de mollusques bivalves en fonction des seuils de contamination fixés par la circulaire n°15/08/12.

Catégorie	Nombre d' <i>Escherichia coli</i> - β -glucuronidase positive/100 g de CLI		
	230	4600	46000
A		0 %	
B		10%	0%
C			0 %
D			>

Tableau 3 : Evaluation du niveau moyen de contamination chimique des zones de production de mollusques bivalves en fonction des seuils de contamination fixés par la circulaire n°15/08/12.

Contamination chimique mg. (kg chair humide) ⁻¹						
Catégorie	Mercure		Cadmium		Plomb	
	0,5		1		1,5	
A, B, C	≤		≤		≤	
D		>		>		>

Matériel et Méthodes

I. Présentation du site d'étude

La zone de Ras EL Ma – Saïdia, située au nord-est du littoral méditerranéen marocain (**figure 6**), est considérée parmi l'une des zones de production conchylicole importante à l'échelle nationale jusqu'à 1998. Elle recelait des gisements naturels de coquillages, notamment la petite praire, les coques, les haricots de mer, les vernis, etc.

Au niveau de cette région, l'activité de la pêche artisanale s'est développée à travers l'exploitation de la petite praire (*Chamelea gallina*). Cette jouissant, d'un intérêt particulier des populations locales, représentait un moyen de subsistance assez important pour eux. C'est une activité de base dans la région littorale orientale où elle a largement prédominé. [Demnati, 2002].

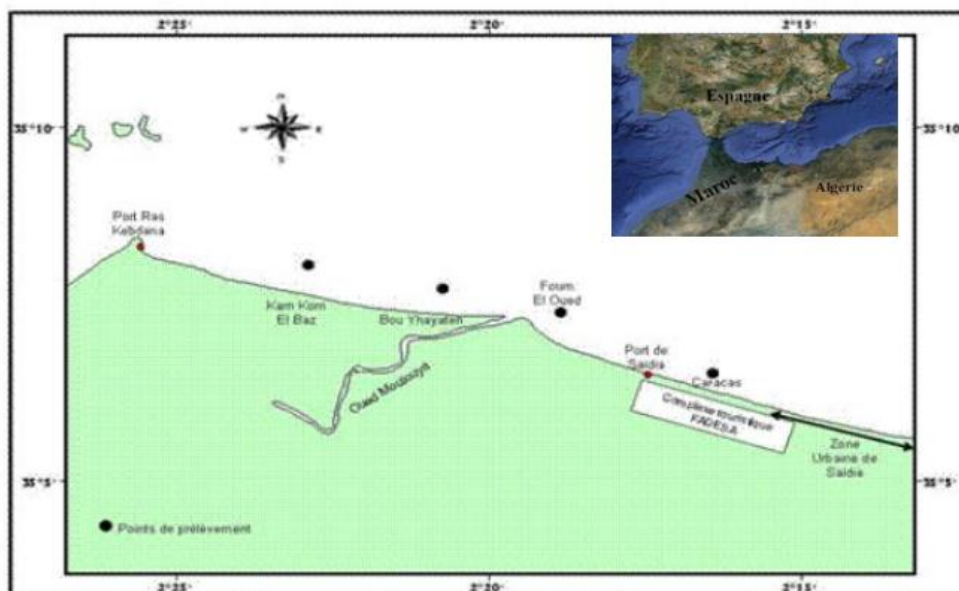


Figure 6 : Localisation géographique des points de prélèvement de site d'étude du littoral de Ras EL Ma-Saïdia [LAYACHI et al, 2014].

II. Matériel biologique

Les deux échantillons bivalves prélevés connaissant une large exploitation au niveau de la région Ras EL Ma-Saïdia. Les deux espèces biologiques analysées durant ce travail sont les suivantes :

- La moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*, se trouvant fixée sur les roches dans les zones de balancement des marées.
- La petite praire *Chamelea gallina*, se reposant sur les sables des régions précitées.

III. Examen bactériologique des mollusques bivalves

Les milieux de culture utilisés durant ce travail, dont la composition chimique et le mode de préparation sont annexés (Annexe1), sont les suivants :

- ✓ Bouillon glutamate.
- ✓ Tryptone bile X-glucuronide (TBX).
- ✓ Tryptone sel.

1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé au début de mois de Mai 2019. Les prélèvements ont été faits d'une façon bimensuelle, pour les deux espèces étudiées, à partir d'un nombre défini de points (sites), après le classement des zones de prélèvement.

En ce qui concerne le nombre des prélèvements, 3 échantillons (de sites différents : Caracas, Foum ElOuad et Kamkoum ElBaz) de la Petite Praire *Chamelea gallina* ont été pris à partir de la région de Ras El Ma, et 2 échantillons (de 2 sites différents) de la Moule *Mytilus galloprovincialis* à partir de la région de Saïdia.

2. Préparation des échantillons

L'échantillon est acheminé rapidement vers le laboratoire dans un sachet en plastique stérile. Le sachet est conservé dans une glacière (de 1 à 8°C, selon la norme ISO 17025) menée d'un accumulateur de froid et un thermomètre. Une fois arrivés au laboratoire, l'échantillon fait l'objet d'un contrôle d'acceptabilité des échantillons (seuls les individus vivants avec une carapace non abîmée sont acceptés. En plus, une vérification de la température de la glacière est effectuée).

Les prélèvements sont identifiés par une étiquette (date, heure, espèce de coquillages et numéro d'enregistrement), bien lavés pour éliminer la saleté, puis égouttés sur un papier absorbant.

Après, 10 à 15 individus, de taille moyenne, sont acheminés à la salle de l'analyse bactériologique.

IV. Analyses microbiologiques

1. Préparation de l'échantillon

L'analyse microbiologique est réalisée pour la recherche de d'*E.coli* bêta-glucuronidase positive. La norme ISO 16649-3 spécifie une méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *E.coli* β -glucuronidase positives par la technique de la mise en culture en milieu liquide et par le calcul du nombre le plus probable (NPP), en utilisant le bromo-5- chloro-4-indolyl-3 beta-D-glucuronate. L'incubation se fait à 37°C puis à 44°C. Cette méthode convient pour le dénombrement d'*E.coli* qui a pu souffrir d'une déshydratation, une congélation, une exposition à un environnement salin (marin par exemple), ou endommagé par des désinfectants.

Le nombre minimal d'individu est 6. La première étape consiste à une ouverture aseptique du coquillage. Le contenu entier (chair et liquide inter valvaire, CLI) est recueilli stérilement. 25 g des espèces de petite taille (*Chamelea gallina*) et 75 g pour les espèces de taille moyenne (*Mytilus galloprovincialis*) sont pris pour l'analyse. Après, une dilution par addition de Tryptone Sel (le volume équivalent au double de la masse de CLI) est réalisé. L'ensemble est soumis au broyage dans un mixeur pendant 30 secondes. Le mélange ainsi obtenu est laissé reposer pour une durée de 15 min. Puis, 30 mL du liquide du broyat est ajouté de 70 mL de Tryptone sel. Ainsi, le liquide obtenu est soumis à un test présomptif.

2. Test présomptif

Le test présomptif est réalisé par un ensemencement de 3 séries, à 5 tubes à essai, contenant le bouillon au glutamate, à simple ((20,2 g/1000 mL) et double concentration (40,4 g/1000 mL) : La série à double concentration est inoculée par 10 mL de la préparation dans un volume final de 10 mL du bouillon glutamate.

Tandis que, la deuxième série est inoculée par 1 mL de l'échantillon, supplémenté de 10 mL du bouillon au glutamate à simple concentration.

Ensuite, une série de dilution décimale est préparée (1 mL de la solution mère dilue dans 9 mL de Tryptone Sel.). Puis, chaque dilution estensemencée dans 10 mL de bouillon au glutamate à simple concentration.

Finalement, une incubation des tubes à essai est faite à 37°C pendant 24h (NM ISO 16649-3).

3. Test confirmatif :

Les tubes positifs, présentant un aspect différent par rapport aux tubes de départ, sont repiqués sur la gélose TBX (un milieu sélectif destiné au dénombrement des *E.coli* -D- β -glucuronidase positive dans les produits alimentaires) en pratiquant des stries d'épuisement.

Le résultat est obtenu directement par comptage des colonies caractéristiques (des colonies bleues ou bleu-vert) après 24h d'incubation dans à 44°C.

La lecture des résultats se fait par la détermination du Nombre le Plus Probable (NPP) d'*E.coli* en fonction du nombre des colonies, bleues ou bleu vertes, sur la gélose TBX. Elle est exprimée en nombre d'*E. coli*/100 g de CLI.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats du suivi microbiologique

Les résultats sont reportés par point de prélèvement dans le Tableau 4 et 5.

En effet, pour la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'espèce prélevée de la région de Saïdia, les dénombrements d'*E.coli* β -glucuronidase positive est de $1,3.10^2$ et 20 *E.coli*/100 g Chair et Liquide Inter valvaire (C.L.I) de coquillage respectivement pour les sites 1 et 2 (Tableau 4). Ces résultats montrent une contamination variable selon les sites de la moule *Mytilus galloprovincialis* par *E. coli* β -glucuronidase positive. Ces valeurs restent faibles et inférieures au seuil fixé par la réglementation (230 *E.coli*/100 g de CLI, circulaire 1508/12 du Ministère de l'agriculture et de la pêche).

Tableau 4 : Niveaux de la contamination par *E. coli* β -glucuronidase positive de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée de la région de Saïdia.

Espèce	Nombre d' <i>E.coli</i> β glucuronidase positive /100 g de CLI	
	Site 1	Site 2
Moule	$1,3.10^2$	20

La même étude a été effectuée sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (dénombrement d'*E.coli* en UFC/100 g CLI au niveau des deux points de prélèvement qui sont Kamkoum El Baz et Bou Yahyatan de la plage Ras Kebdana) durant la période allant de 2009 jusqu'à 2010, dont les valeurs enregistrées sont : $3,5. 10^2$ UFC/100 g CLI en mois de janvier 2009 et $2,4. 10^2$ UFC/100 g CLI en mois de mars 2010 au niveau du point Kamkoum El Baz, et pour le point Bouyahyaten une valeur de $3,310^2$ UFC/100 g CLI a été enregistrée en mois de mars 2010 [LAYACHI et al, 2014]. ce résultat dépassant le seuil fixé par la réglementation (230 *E.coli*/100 g de CLI) adoptée par la circulaire 1508/12 du Ministère de l'agriculture et de la pêche, donc la moule de la période de 2009-2010 est non conformes et très contaminé par rapport au résultat mentionné dans le tableau 4.

En ce qui concerne la petite prairie *Chamelea gallina*, prélevée de la région de Ras EL Ma, au niveau de 3 sites (Caracas, Foum ElOued et Kamkoum ElBaz), les dénombrements d'*E.coli* β -glucuronidase positive est de $1,3.10^2$, 20 et $1,3.10^2$ *E.coli*/100 g Chair et Liquide Inter valvaire (C.L.I) de coquillage respectivement pour les sites Kamkoum ElBaz, Foum ElOued et Caracas (Tableau 5).

Ces résultats montrent une contamination, par *E. coli* β -glucuronidase positive, variable selon les sites de prélèvements. Cependant, ces valeurs restent faibles et inférieures au seuil fixé par la réglementation (230 *E.coli*/100 g de CLI) adoptée par la circulaire 1508/12 du Ministère de l'agriculture et de la pêche durant la période d'étude. Toutefois, l'étude réalisée sur la petite prairie pendant le mois d'Octobre 2011 par [LAYACHI et al, 2014] qui a montré des valeurs élevée d'*E.coli* avec 700 UFC/100 g CLI au niveau du site (Foum El Oued) et 460 UFC/100 g CLI au niveau du site 2 (Bouyahyaten). Ces taux de contamination sont le résultat de la proximité de l'embouchure d'oued Moulouya qui draine la totalité des contaminants issus de l'activité agricole pratiquée le long du bassin versant et des rejets urbains.

Tableau 5: Niveaux de la contamination par *E.coli* β -glucuronidase positive de la petite prairie (*Chamelea gallina*) prélevée de la région de Ras El Ma.

Espèce	Nombre <i>E.coli</i> β glucuronidase positive /100 g de CLI		
	Kamkoum El Baz	Foum el Oued	Caracas
La petite prairie	$1,3.10^2$	20	$1,3.10^2$

Conclusion générale

Les fruits de mer et en particulier les mollusques bivalves sont des organismes filtreurs de l'eau et concentrent les toxines et les microorganismes comme *E.coli* pathogènes. La consommation des coquillages contaminés constitue un risque de santé public majeur, d'où l'importance de surveillance de la salubrité des zones de collecte et d'élevage de ces coquillages. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon stage effectué au niveau du laboratoire de la Surveillance et le Suivi du Milieu Marin au sein de centre régional de l'INRH de Nador.

L'étude de la qualité microbiologique des mollusques bivalves étudiés, la moule méditerranéen *Mytilus galloprovincialis* et la petite praire *Chamelea gallina*, prélevés de la région de Ras El Ma-Saïdia a montré une conformité à 100% avec la réglementation marocaine (230 *E.coli*/100 g de CLI vis-à-vis d'*E.coli* β -glucuronidase positive est le seuil fixé la circulaire 1508/12 du Ministère de l'agriculture et de la pêche durant la période d'étude).

Cependant, pour pouvoir faire un classement des zones conchyliques, il faut prolonger la durée de l'étude et augmenter le nombre d'échantillons à analyser.

Références bibliographiques :

- Anonymous, Morroco Foodborne disease outbreaks, searchable data 2000-2005, Yearly Reports 2000,2001,2002,2003,2004.
- COKHEN N., ENNAJI H., HASSAR M., KARIB H: the bacterial quality of red meat and offral in Casablanca (Morocco).Mol.Nutr.Food Res.2006, 50.557.562.
- Demmnati S. Chafi A. Attrassi B. Haloui B .Maamri A .Kharboua M. Ramdani M.2002 bioaccumulation des métaux lourds chez l'oursin sur côte EST de méditerrané marocaine. Actes.Inst.Agron.Vet. Hassan 2 .Rabat.22(2) ; 79-84.
- DWAAL, S C., BARLOW K, ALDERTON L., JACOBSON M. F OUTBREAK alert! Center for sciences in public Interest (CSPI): Washington, 2001, 48p).
- El Hamzaoui R. (2011). L'apport de la géométrie dans la gestion des zones côtiers. Application d'un SIG Côtière (Rif nord occidental, Maroc).
- KM Kocot et al. 2011 Nature 447(736).
- Pommpuy.M. M, Hervio Health.D, caprais M.P .Gourmelon M, le saux J.C le Guyader S.2005 fecal contamination in coastal areas. Edited by blkins, springer. New York USA .331- 359.
- Stansby .M.E (1962) .proximate composition of fish .Fish in nutrition. In E. Henn and R.Kreuzer (editors), 55-60. Fish, (Books) Ltd., Lond.

Références webographiques :

-  **Veille technologique en agroalimentaire. Les produits de la mer au Maroc**
.<http://eilleagro.imist.ma/index.php/produit-et-machinisme/ingredients-et-nutrition/533-les-produits-de-la-mer-au-Maroc>. (Consulté le 20/05 /19).
-  **<http://www.inrh.ma/fr/publications/bulletin-de-surveillance-sanitaire-des-zones-de-production-conchylicole-ann%C3%A9e-2015>**(consulté le 28/05/19).
-  **[http:// blog plongée. Fr/ Up- content /uploads/2011/11/Cours biologie-marine mollusques-ppt-ligne PDF](http://blog.plongee.fr/uploads/2011/11/Cours_biologie-marine_mollusques-ppt-ligne_PDF)**. (Consulté le 26 /05/219).
-  **<https://fr.wikipedia.org/wiki/Bivalvia>**(consulté le 26/05/19).
-  **<https://www.mer-littoral.org/14/bivalves.php>**(consulté le 26/05/19).
-  **www.inrh.ma/fr/centre-regional-nador**]. (Consulté le 22/05/19).
-  **www.inrh.ma/fr/historique**.(consulté le 20/05 /19) .
-  **www.inrh.ma/fr/publications/rapport-dactivite-2013**.(consulté le 20 /05 /19)
-  **[\[http://plongee.cours.free.fr/bio/images/mollusques/F.69.Bivalve.P.73.JPG\]](http://plongee.cours.free.fr/bio/images/mollusques/F.69.Bivalve.P.73.JPG)**
(Consulté le 24/05 /2019).

Annexes

Annexe 1 :

Bouillon Tryptone –sel

Le bouillon Tryptone sel est un diluant destiné à la préparation des suspensions mère de laits en poudre et concentrés, de produit laitiers et d'autres produits alimentaire en vue de leur analyse microbiologique, il est également utilisé pour effectuer les dilutions décimales.

Bouillon glutamate

Le bouillon glutamate est utilisé pour la recherche présomptive et le dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux, ainsi que des *Escherichia coli* présumés par la méthode de nombre la plus probable dans les eaux. Ce milieu également utilisé pour la recherche des coliformes totaux et fécaux dans la gélatine alimentaire. Enfin, il est aussi adapté à la numération des *E.coli* bêta Glucoronidase positive dans les produits alimentaires par technique NPP décrite dans la spécification technique XP ISO/TS1664963 (V08-031_3).

La présence des bactéries coliformes est mise en évidence par la production de gaz à partir du lactose ainsi que le virage au jaune de pourpre de bromocrésol. Les entérocoques ne cultivent pas sur ce milieu, en raison de l'absence des substances nutritives essentielles à la culture.

GELOSE TBX

La gélose TBX est un milieu sélectif destiné au dénombrement des *E.coli* bêta Glucoronidase positive dans les produits alimentaires. Le résultat est obtenu directement par le comptage des colonies caractéristique après 24 heures d'incubation, sans qu'il soit nécessaire de pratiquer une étape de confirmation.

Les sels biliaires inhibent la croissance des microorganismes à gram positive et favorisent la récupération des *E.coli*. La plupart des souches d'*E.coli* possédant une bêta Glucoronidase agit avec le milieu TBX, entraînant une coloration bleu vert.

Les réglementations Marocaines :

Circulaire N°1508/12 du 15/08/2012 : circulaire ministérielle relative aux conditions sanitaires de production et de mise sur le marché des mollusques bivalves vivants. Ministère de l'Agriculture Rurale et des Pêches Maritimes 15p.