

Prévalence et potentiel de virulence *in vitro* de *Aeromonas* sp. chez la grenouille comestible *Hoplobatrachus occipitalis* (Ranidae) collectée dans le Centre Ouest de la Côte d'Ivoire

[Prevalence and *in vitro* potential virulence of *Aeromonas* sp. from edible frog *Hoplobatrachus occipitalis* (Ranidae) collected in Middle West of Côte d'Ivoire]

Casimir Yatanan BLÉ¹, N'dédé Théodore DJENI¹, Adjéhi DADIÉ¹, Moussa CISSÉ², Bassa Antoine YOBOUET¹, Koffi Marcelin DJÉ¹, and Agathe FANTODJI³

¹Département des Sciences et Techniques des Aliments (STA), Laboratoire de Microbiologie et Sécurité Alimentaire, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire, Université Nangui Abrogoua, Côte d'Ivoire

²Département de Production Animale (PA), Laboratoire de parasitologie et microbiologie, Université Nangui Abrogoua, Côte d'Ivoire

³Département de Production Animale, Laboratoire de cytologie animale, Université Nangui Abrogoua, Côte d'Ivoire

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Edible frogs *Hoplobatrachus occipitalis* represent an animal protein source for most population of West area of Côte d'Ivoire, whose sanitary quality are understand. The objectives of this study was to determinate the rate of *Aeromonas* sp. from these frogs and to evaluate *in vitro* potential virulence of the strains. A total of 300 frog including 210 fresh and 90 smoked from three markets were collected. The analyses of samples consisted to isolation of *Aeromonas*, the biotype and the determination of *in vitro* virulence factors. The results reveal that no smoked frog is contaminated; on other hand, the percentage of contamination of fresh frog is 23.0% with the prevalence of 70.5%. Species *Aeromonas hydrophila* (76.4 %) and *Aeromonas sobria* (23.6%) have been exclusively identified. The biotype of *Aeromonas hydrophila* characterized by no utilization of mannose and citrate was most frequent (41.7%). The determinants of the virulence of strains are the production of hemolysin (70.1%), protease (68.9%), ADNase (97.3%), lipase (41.1%) and amylase (55.4%). The high prevalence of *Aeromonas* with a potential pathogen from edible frog, represent a risk for consumers and require the measure of assurance for the sanitary safety of products.

KEYWORDS: *Hoplobatrachus occipitalis*, *Aeromonas*, virulence, Côte d'Ivoire.

RESUME: Les grenouilles comestibles, *Hoplobatrachus occipitalis*, représentent une source de protéine animale pour la plupart des populations de l'ouest de la Côte d'Ivoire, dont la qualité sanitaire demeure inconnue. L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence de *Aeromonas* sp. chez ces grenouilles et d'évaluer le potentiel de virulence *in vitro* des souches. Au total 300 grenouilles dont 210 fraîches et 90 fumées ont été collectées sur trois marchés. L'analyse des échantillons a consisté à l'isolement de *Aeromonas*, le biotypage et la détermination de la virulence *in vitro*. Les résultats révèlent qu'aucun échantillon de grenouille fumée n'est contaminé; par contre, le taux de contamination des grenouilles fraîche est de 23,0 % avec une prévalence de 70,5 % en *Aeromonas*. Les espèces de *Aeromonas hydrophila* (76,4 %) et *Aeromonas sobria* (23,6 %) ont été exclusivement identifiées. Le biotype de *Aeromonas hydrophila*, caractérisé par la non utilisation du mannose et du citrate a été le plus fréquent (41,7 %). Les déterminants de la virulence des souches sont la production d'hémolysine (70,1 %), de protéase (68,9 %), d'ADNase (97,3 %) de lipase (41,1 %) et d'amylase (55,4%). La

prévalence élevée de *Aeromonas* à potentialité pathogène chez des grenouilles comestibles, représente un risque pour les consommateurs et nécessite des mesures d'assurance de la sécurité sanitaire des produits.

MOTS-CLEFS: *Hoplobatrachus occipitalis*, *Aeromonas*, virulence, Côte d'Ivoire.

1 INTRODUCTION

Aeromonas est une bactérie ubiquiste Gram négative, oxydase positive et anaérobie facultative appartenant à la famille des Aeromonadaceae et à la classe des Gammaproteobacteria [1]. Certaines espèces du genre *Aeromonas* sont des pathogènes stricts ou opportunistes pour l'homme. Il s'agit notamment de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. trola*, *A. schubertii* [2]. Le microorganisme est largement distribué sur tous les continents et est un agent pathogène causant des variétés de maladies chez plusieurs espèces de poissons, des animaux et des humains [3]. La pathogénicité de *Aeromonas* sp est complexe et multifactorielle [4]. Elle est attribuée à plusieurs facteurs de virulence extracellulaires : hémolysine, aérolysine, protéase, ADNase, lipase, élastase, lécithinase, gélatinase, amylase, chitinase [5]. Longtemps considérée comme une bactérie opportuniste pour l'homme, *Aeromonas* sp est actuellement reconnue comme un pathogène émergent impliqué dans plusieurs infections gastro-intestinales et extra-intestinales humaines telles que les gastroentérites, les septicémies, les infections des plaies, les vomissements, les douleurs abdominales, les fièvres, les méningites et les endocardites [6], [7]. Quoique ce microorganisme pathogène peut infecter les individus sains, la plupart des infections sont trouvées chez les enfants, les vieillards et les hôtes immuno-compromis spécialement [8]. *Aeromonas hydrophila* sont également connus pour responsable des maladies des pattes rouges « red- leg disease » et sont impliqués dans les cas de mortalité massive des grenouilles en captivités et dans le milieu naturel [9]. Cette maladie se traduit par une flaccidité des muscles, des hémorragies, des ulcérations cutanées et parfois une septicémie foudroyante. L'infection de l'homme par *Aeromonas* est généralement due au contact avec l'animal, ou à l'ingestion du microorganisme dans les aliments contaminés mal cuits ou dans l'eau de boisson. Ainsi, des cas de toxi-infections d'origine alimentaire dues à *Aeromonas* ont été signalés. En 2004, 453 cas d'infections ont été signalés aux États-Unis et 99 cas en France [5]. En 2012, une épidémie de toxi-infection alimentaire due à *Aeromonas hydrophila* a été déclarée dans un collège en chine chez 14 % des collégiens [7].

En Afrique, *Aeromonas* a été principalement isolé au Nigeria [10], [6] ; en Lybie [11] et en Egypt [12] de poissons, de poulets et chez l'homme.

La consommation de la viande de grenouille est réelle en Côte d'Ivoire et fait partie des habitudes alimentaires de certains peuples de l'ouest notamment les Yacouba, Guéré et Wobé. C'est une importante source de protéine animale très appréciée et l'espèce la plus consommée par ces peuples est *Hoplobatrachus occipitalis* [13], [14]. C'est un type d'amphibien appartenant à l'ordre des anoures, à la famille des ranidae, dont la masse corporelle est comprise entre 24 et 176 g et la taille entre 6,8 et 10,8 cm [15]. Les grenouilles destinées à la consommation humaine, sont capturées dans des étangs piscicoles abandonnés, des rizières, des marécages et ensuite, vendues sur les marchés sous forme fraîche ou fumée. Depuis que l'Agence Nationale d'Appui au Développement Rural (ANADER) a abandonné ses étangs expérimentaux pour une production contrôlée et sécurisée de grenouilles en Côte d'Ivoire, toute la filière, de la production à la consommation est exclusivement artisanale et informelle. Par conséquent, dans un tel contexte d'absence de contrôle sanitaire de la denrée, le risque lié à la consommation des grenouilles contaminées, ainsi que le degré d'exposition des consommateurs en Côte d'Ivoire peuvent être élevés. De plus, si des études précédentes ont été réalisées sur la taxonomie, la systématique et le régime alimentaire de grenouilles [16], il n'existe pas de données sur la sécurité sanitaire et spécifiquement, sur le risque de contamination à *Aeromonas*, agent pathogène en émergence, dont les réservoirs sont les étangs naturels et les marécages [5], lieu de capture de ces animaux.

L'augmentation progressive de la consommation de grenouille en Côte d'Ivoire et de la fréquence des intoxications alimentaires liées à des *Aeromonas* dans le monde, suscitent le besoin de production de données dans le but d'une sécurisation de la filière et la protection de la santé du consommateur.

L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence et le potentiel de virulence *in vitro* de souches de *Aeromonas* isolés de grenouilles, *Hoplobatrachus occipitalis*, collectées dans le centre ouest de la Côte d'Ivoire.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 COLLECTE DES ECHANTILLONS

Au total 300 grenouilles de l'espèce *H. occipitalis*, dont 210 sous forme fraîche (95 mâles et 115 femelles) et 90 sous forme fumée, ont été collectées sur les marchés de Daloa, Issia et Sinfra, villes situés au centre-ouest de la Côte d'Ivoire. Les grenouilles apparemment saines ont été achetées le matin (6 h-8 h) auprès des collecteurs et vendeurs. Les grenouilles ont été mises individuellement dans des sachets stomacher stériles qui ont été étiquetés et conservés à + 4 °C dans une glacière contenant des carboglaces, puis transportées au laboratoire de Bactériologie du Pôle Aquaculture et Pêche de l'Université Nangui Abrogoua, Abidjan (Côte d'Ivoire). Les grenouilles collectées ont été l'objet d'une analyse bactériologique. Sur chaque grenouille fraîche, trois organes constitués de l'intestin, de la peau et du muscle ont été analysés. Au niveau de la forme fumée, c'est le muscle de la grenouille qui a été analysé.

2.2 ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

La grenouille fraîche a été soigneusement examinée par observation directe avant et après dissection afin de rechercher d'éventuels symptômes ou signes de maladie dus à *Aeromonas* sp sur la face ventrale des grenouilles et sur les pattes postérieures. Les ulcères cutanés, le gonflement de la région abdominale due à une inflammation viscérale, des rougeurs aux pattes arrière et au bas ventre, la flaccidité de la rate, l'assombrissement brun-rouge ou noire du foie ont été recherchés.

L'isolement de *Aeromonas* a été effectué selon la méthode de [3] avec une légère modification. Une masse de 5 g de la peau et du muscle a été prélevée individuellement, broyée et homogénéisée dans 45 mL d'eau peptonnée tamponnée (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) tandis que 1 g de l'intestin a été dilué dans 9 mL de la même solution tampon. Chaque bouillon obtenu a été incubé à 37 °C pendant 24 h pour enrichissement.

Un aliquote de 0,1 ml de chacun des solutions d'enrichissement a été ensemencé sur la gélose *Aeromonas* agar (Sigma Aldrich, India) supplémenté à l'ampicilline, 30 mg/L. Les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h.

Cinq colonies présomptives de *Aeromonas* qui se caractérisent par une coloration verte à centre noire sur la gélose *Aeromonas* agar supplémenté à l'ampicilline, 30 mg/L ont été repiquées sur une gélose nutritive alcaline (Bio-Rad, Paris, France) et incubées à 37 °C pendant 24 h. À partir des isolats à Gram négatif, catalase et oxydase positives, les caractères biochimiques ont été déterminés par culture d'une galerie d'identification [16]. La capacité de *Aeromonas* à croître sur les milieux contenant ou non du NaCl a été réalisée dans du bouillon nutritif à différentes concentration de NaCl (0 ; 2 et 6 % de NaCl) et incubées à 37 °C pendant 24 h. Le biotypage des souches de *Aeromonas* a été réalisé sur galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.3 DETECTION DES FACTEURS DE VIRULENCE DES SOUCHES DE *AEROMONAS*

2.3.1 HÉMOLYSINE

La mise en évidence de la production de l'hémolysine par la bactérie a été réalisée selon la méthode décrite précédemment par [17]. À cet effet, une culture de *Aeromonas* a été réalisée sur une gélose base (Bio-Rad, Paris, France) additionnée de 5 % de sang de mouton. L'incubation a été effectuée à 37 °C pendant 24 h. La présence d'un halo claire autour de la colonie traduit la production d'hémolysine par la bactérie.

2.3.2 ADNASE

La recherche de l'ADNase a été réalisée par culture de la souche de *Aeromonas* sur une gélose à l'ADN (Difco), qui a été incubée à 37 °C pendant 24 h. Au terme du temps d'incubation, la surface de la gélose a été inondée de solution d'acide chlorhydrique 1N pendant 3 min. La production d'ADNase est marquée par la présence d'un halo clair autour des colonies observées sur un fond noir.

2.3.3 PROTÉASE

L'activité protéasique des souches a été recherchée en utilisant une gélose nutritive additionnée de 10 % de lait écrémé (Himedia, Inde). Après une incubation de la culture de *Aeromonas* à 37 °C pendant 24 h, la formation d'une zone claire autour des colonies, causée par la dégradation de la caséine, traduit la production de protéase par la bactérie [18].

2.3.4 LIPASE

La mise en évidence d'une lipase a été réalisée par culture des souches sur une gélose à la tributyrine 0,5 %, (Panreac, Barcelone, Espagne) émulsionnée avec 0,2 % de Triton X-100. La présence d'une zone transparente autour des colonies traduit une activité lipasique [19].

2.3.5 AMYLASE

La détermination de la production d'une amylase a été faite selon la méthode de [20], dans 1 % (P/V) d'agarose (Merck, Allemagne) contenant 0,4 % (P/V) d'amidon dans du PBS. La souche amylase positive se traduit par la présence d'une zone claire autour de la colonie.

2.4 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

Les données ont été saisies avec le logiciel de traitement de données IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, SPSS Inc, Chicago, USA) et transférés sur Excel. Les différentes proportions ont été comparées en utilisant le test de Khi-carré. La différence entre les variables a été considérée comme significative à $p < 0,05$.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 PREVALENCE DE *AEROMONAS* SP DANS LA VIANDE DE GRENOUILLE

Les grenouilles analysées étaient apparemment saines, car aucun signe d'infection n'a été observé sur les organes au cours de l'examen macroscopique. Cependant, 48 (22,9 %) grenouilles fraîches étaient contaminées par *Aeromonas* sp. Cela dénote de l'importance du portage asymptomatique de *Aeromonas* sp chez l'espèce *H. occipitalis* analysée et du rôle éventuel qu'elle peut jouer dans la transmission du microorganisme. Le taux de contamination obtenu est plus élevé que celui (8,8%) trouvé chez les espèces *Rana catesbeiana*, *R. clamitan* et *R. pipiens* au Canada [10]. Il en est de même pour [21] qui ont rapporté des taux de 18,4 % de *A. hydrophila* et 13,2 % de *Aeromonas* sp au cours de leur étude sur *Rana catesbeiana*. Par ailleurs, *A. sobria* a également été isolés par [22] sur *Rana temporaria* à un taux de 3,1 %.

Toutefois les valeurs du taux de contamination obtenues dans cette étude sont faibles par rapport à celle rapportées par plusieurs autres auteurs. Il s'agit notamment de l'étude de [22] précédemment évoquée, qui rapporte un taux de 37,5 % de contamination par *A. hydrophila* et de celle de [23], qui ont enregistré un taux de 32 % chez les grenouilles juvéniles et adultes. Mais, de toutes ces données, le taux (86 %) obtenu par [24] est de loin, le plus élevé.

Chez les grenouilles fumées, l'analyse de 90 échantillons de l'espèce *H. occipitalis* n'a révélée aucune contamination par *Aeromonas* sp. Le résultat obtenu pourrait se justifier non seulement par la possible élimination des microorganismes au cours du fumage tel que rapporté par [25].

L'étude a permis de montrer que les grenouilles sont contaminées indépendamment des sites de prélèvement. Le taux de contamination le plus élevé a été observé au niveau des échantillons prélevés à Issia (29,8 %), suivi de Daloa (24,2 %) et Sinfra (11,7 %) (tableau 1). La différence de contamination des grenouilles d'un site de collecte à l'autre était significative (Khi-carré = 6,60 ; ddl = 2 ; $p = 0,037$). Le résultat pourrait être lié aux caractéristiques environnementales des sites ; selon que les facteurs de développement de *Aeromonas* sont plus ou moins importants. Du point de vu facteurs, il peut s'agir, comme l'ont rapporté certains auteurs, de conditions nutritionnelles des grenouilles, de la qualité microbienne de l'eau d'approvisionnement, du climat et autres facteurs environnementaux [26], [27]. Des résultats similaires ont été rapportés par [23], qui ont trouvé que le taux de contamination variait considérablement selon le site de collecte.

Une visite des sites de capture des grenouilles, représentés par des rizières, des étangs et des marres, a permis de constater leur état d'insalubrité particulier. On note en effet, un haut niveau de pollution apparent, qui pourrait expliquer que les prévalences en *Aeromonas* sp des grenouilles soient si élevées comme le révèlent les résultats obtenus dans cette

étude. Les milieux évoqués sont connus pour être des réservoirs de *Aeromonas* et d'autres agents pathogènes de l'environnement [10]. Le lien entre des conditions environnementales insalubres et la prolifération de *Aeromonas* a été précédemment évoquée par [28], lors de leur étude sur la détection de *A. sobria* chez le poisson *H. molitrix* en Inde. Ces prévalences élevées en *Aeromonas*, peuvent aussi être liées au fait que les grenouilles analysées dans cette étude, n'ont pas été prélevées directement dans leur milieu naturel, mais plutôt sur des marchés. Selon [29], la mauvaise conservation et le passage dans un circuit de commercialisation sont le plus souvent à l'origine d'une contamination accrue et/ou d'une prolifération des bactéries.

Tableau 1 : Prévalence de *Aeromonas* sp. dans les grenouilles selon les sites de prélèvement

Sites	Grenouilles analysées	Grenouilles contaminées (%)	<i>Aeromonas</i> sp. isolés	Prévalence (%)
Issia	84	25 (29,8)	81	96,4
Daloo	66	16 (24,3)	43	65,1
Sinfra	60	7 (11,7)	24	40
Total	210	48 (23,0)	148	70,5

(Khi-carré = 6,60 ; ddl = 2 ; p = 0,037).

3.2 CONTAMINATION DES GRENOUILLES SELON LE SEXE ET LES ORGANES

Sur un total de 95 grenouilles mâles analysées, 18,9% (18) étaient contaminées par *Aeromonas* sp. contre 26,1% (30) pour les femelles (tableau 2). L'analyse statistique ne montre pas de différence significative de contamination par *Aeromonas hydrophila* (Khi-carré = 0,72 ; ddl = 1 ; P = 0,39) et *A. sobria* (Khi-carré = 0,59 ; ddl = 1 ; P = 0,300) entre les grenouilles mâles et femelles. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'études antérieures. En effet, [9], n'ont pas observé de différence significative de prévalence en *Aeromonas* entre grenouilles mâles et femelles. Le même constat a été fait par [24], qui ont mené des études similaires sur six espèces de grenouilles et une espèce de crapaud. Cependant, ces données contrastent avec celles de [23], qui ont enregistré un taux de contamination élevé chez les grenouilles mâles (38 %) que chez les femelles (34 %).

Dans cette étude, sur 630 organes frais analysés, 84 (13,3%) étaient contaminés par *Aeromonas* sp. Les taux de contamination dans l'ordre décroissant étaient de 21,4% pour l'intestin, suivi de la peau (19,5%) et du muscle (4,2%). Le test de khi-carré a montré qu'il y a une différence significative entre les taux de contamination selon les organes (Khi-carré = 25,302 ; ddl = 2 ; p = 0,001).

Les résultats de la répartition des souches selon les organes colonisés (tableau 3) montrent que l'intestin constitue la zone de forte concentration de *Aeromonas* sp (42,4%) suivi de la peau (19,5%). Ce constat se justifie par le fait que *Aeromonas* sp fait partie de la flore microbienne normale de la peau et des intestins des grenouilles saines mais est aussi connu pour causer des maladies chez ces animaux [30].

Contrairement à l'intestin et à la peau, le muscle ou la carcasse était très peu contaminé (6,7% de *A. hydrophila* et 2% de *A. sobria*). Au Brésil, [31], n'ont pas du tout trouvé de *Aeromonas* sp après analyse de cuisses de grenouilles congelées.

Comme l'ont relevé certains auteurs [32], [33], la présence de *Aeromonas* sp sur la carcasse de grenouilles, peut être liée à une contamination croisée durant la capture, la manipulation et le transport de l'animal. Dans le cadre de cette étude, les observations montrent qu'au cours de la capture des grenouilles par les collecteurs, les instruments utilisés, le plus souvent des flèches, perforent les organes de l'extérieur (peau) vers l'intérieur (intestin, poumon, cœur) de l'animal. Il s'en suit alors une contamination des organes précédemment exempts. Par ailleurs, les grenouilles collectées avec les organes endommagés ou non sont introduites dans les mêmes récipients non désinfectés et acheminées sur les marchés. Il pourrait dans un tel cas, avoir un transfert de germes d'une part, de la peau ou du contenu intestinal à la carcasse ou encore du récipient souillé, à la carcasse.

La contamination de la peau de grenouilles par *Aeromonas* sp peut également être liée aux propriétés de résistance spécifique à certains antimicrobiens chez ce microorganisme. En effet, de par leur écologie, les grenouilles vivent généralement dans un environnement plurimicrobien [34]. Parfois, pour se défendre des agressions de la flore environnante, elles produisent les peptides antimicrobiennes au niveau de leur peau, à l'effet de résister à l'action invasive des pathogènes

[35], [34]. Des études ont montré que *Aeromonas* sp développe une résistance aux sécrétions peptidiques de la peau des grenouilles par la production d'une protéase qui dégrade ces peptides [34], [33].

Au total, 148 souches ont été isolées et deux espèces du genre *Aeromonas* sp ont été identifiées au cours de cette étude. Il s'agit notamment de *Aeromonas hydrophila* et de *Aeromonas sobria*. *Aeromonas hydrophila* a été l'espèce la plus rencontrée, soient 113 (76,4 %) souches par rapport à *Aeromonas sobria*, 35 (23,6%) souches. Les résultats obtenus concordent avec ceux de plusieurs auteurs qui ont mis en évidence de façon préférentielle, *Aeromonas hydrophila* [5]. De plus, cette espèce est connue pour être le plus souvent associée aux « maladies des pattes rouges » et impliquée dans les cas de mortalité massive des grenouilles en captivités et dans le milieu naturel [5, 9].

Tableau 2 : Le taux de contamination de *H. occipitalis* par *A. hydrophila* et *A. sobria* selon le sexe et les organes et la Répartition des espèces de *Aeromonas* sp isolés de *H. occipitalis* selon les organes

Espèces isolées	Organes contaminés (%)			Nombre souches isolées (%)			Total (%)
	Intestin	Muscle	Peau	Intestin	Muscle	Peau	
<i>A. hydrophila</i>	29 (13,8)	7 (3,3)	19 (9,0)	68 (32,4)	14 (6,7)	31 (14,8)	113 (76,4)
<i>A. sobria</i>	16 (7,6)	3 (1,4)	10 (4,8)	21 (10,0)	4 (2,0)	10 (4,8)	35 (23,6)
Total	45 (21,4)	10 (4,7)	29 (13,8)	89 (42,4)	18 (8,6)	41 (19,5)	148

N : Nombre d'échantillon analysé

3.3 BIOTYPES DES *AEROMONAS* SP

A l'analyse des caractères biochimiques, deux et cinq profils biochimiques différents, ont été obtenus respectivement pour *A. sobria* et *A. hydrophila* (tableau 4). Les profils biotypiques de *A. hydrophila* se différencient par l'utilisation ou non du mannose, de la gélatine, du citrate, de la production de gaz à partir du glucose et de la fermentation du lactose. Les résultats obtenus montrent une faible diversité biochimique des souches identifiées par rapport au nombre de profils biotypiques (15 biotypes) rapportés par [37]. Cette grande hétérogénéité des espèces de *A. hydrophila* est due à une pression environnementale locale [37]. Le biotype B3 de *A. hydrophila* de notre étude est identique au biotype AH1 isolé du milieu marin rapporté par [3] et qui héberge le gène de virulence AHCTOEN, l'entérotoxine cytolytique. Ce gène est le plus souvent impliqué dans la mortalité massive de poissons.

Les deux biotypes (P1 et P2) de *A. sobria* obtenus dans cette étude, sont identiques à ceux rapportés par [38]. Par ailleurs, les cinq biotypes de *A. hydrophila*, à l'exception de l'absence d'une lysine décarboxylase (LDC), sont identiques à ceux rapportés par [38] qui ont identifié des souches avec une lysine décarboxylase positive. Plusieurs biotype de *A. hydrophila* à LDC négatif ont été également rapportés [39], [40]. Cette étude confirme la délicatesse du biotypage en termes de pouvoir discriminant, eu égard à l'hétérogénéité phénotypique exprimée par les espèces, comme l'ont relevé d'autres auteurs [41].

Tableau 4 : Différents biotypes identifiés chez *A. hydrophila* et *A. sobria* isolés des grenouilles

Caractères biochimiques	Différents biotypes identifiés						
	B1	B2	B3	B4	B5	P1	P2
OX	+	+	+	+	+	+	+
CAT	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
GAZ	-	+	+	-	+	+	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	+	+	-	+	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+	+	+	+
TRP	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	-	-	-
GEL	+	+	+	-	+	+	+
PNPG	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	-	+	-	-	-
MNE	-	+	+	-	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	-	+	+	+
ADI	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	+	+	-	+	+	-
CIT	-	+	+	-	+	+	+
PAC	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 0%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 2%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6%	-	-	-	-	-	-	-
F %	40,7	27,4	7,9	20,3	3,5	68,6	31,4

B1 à B5: biotypes de *A. hydrophila*; P1 et P2 : biotypes de *A. sobria*; (+) : réaction positive; (-) : réaction négative

NO₃ : nitrate de potassium; TRP : tryptophane; GLU : glucose; ADH : arginine; URE : urée; ESC : esculine; GEL : gélatine; PNPG : p-nitrophényl-β-D-galactopyranoside; ARA : arabinose; MNE : mannose; MAN : mannitol; NAG : N-acétyl-glucosamine; MAL : maltose; GNT : gluconate; CAP : caprate; ADI : adipate; MLT : malate; CIT : citrate; PAC: phényl-acétate; OX : oxydase; CAT : catalase, LDC : lysine décarboxylase; H₂S : Sulfure d'hydrogène, F : Fréquence d'isolement

3.4 FACTEURS DE VIRULENCE DES SOUCHES DE *AEROMONAS*

Les souches de *Aeromonas* sp isolées de la grenouille fraîche sont potentiellement pathogènes. Elles sont susceptibles de produire au moins un des facteurs de virulence étudiés (tableau 5). Les facteurs de virulence mis en évidence sont dans l'ordre décroissant ADNase (97,3 %), β-hémolysine (70,1 %), protéase (68,9 %), amylase (55,4 %) et lipase (41,1 %). Les facteurs de virulence de *Aeromonas* sp varient en fonction des espèces. Hors-mis la protéase, le taux de souches de *A. hydrophila* produisant chacun des facteurs de virulence recherchés est plus élevé que ceux de *A. sobria*. Toutefois les différentes proportions excepté celle de l'ADNase ne diffèrent pas significativement selon les deux espèces de *Aeromonas*. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par [42], [42], [43]. [44] a établi une corrélation positive entre l'activité hémolytique et la pathogénicité des souches de *Aeromonas* sp. Par ailleurs, la protéase est un facteur important dans la détérioration des aliments. Elle endommage les tissus et intervient dans l'étiologie des infections et sa mise en évidence chez une souche est un indicateur de sa pathogénicité [45], [46]. Les lipases interviennent dans la nutrition de la bactérie mais elles altèrent la structure de la membrane cytoplasmique de l'hôte et exacerbent sa pathogénicité avec la présence du gène aerolysine [47].

Ainsi, la production d'une grande variété de ces enzymes par les souches de *Aeromonas* contribue à sa large distribution et à sa grande adaptabilité aux changements environnementaux. Il est donc probable que la grenouille fraîche comestible *Hoplobatrachus occipitalis* collectée dans le Centre Ouest de la Côte d'Ivoire pose un risque de toxi-infection alimentaire.

Afin d'éviter la survenue d'incident grave sur la santé de la population consommatrice de grenouilles fraîches, il est impérieux d'adopter des mesures efficaces, au cours du processus de collecte et de vente, pour réduire leur contamination par les microorganismes en général et par *Aeromonas* de façon particulière.

Tableau 5 : Facteurs de virulence in vitro de *A. hydrophila* et *A. sobria* isolés des grenouilles

Tests de virulence	Souches positives (%)		Total (n = 148)	Significativité (p)
	<i>A. hydrophila</i> (n=113)	<i>A. sobria</i> (n=35)		
ADNase	113 (100)	31 (88,6)	144 (97,3)	0,003
Hémolysine	82 (72,6)	23 (65,7)	105 (70,1)	0,435
Protéase	76 (67,3)	26 (74,2)	102 (68,9)	0,432
Amylase	63 (55,7)	19 (54,3)	82 (55,4)	0,499
Lipase	41 (36,3)	12 (34,3)	53 (41,1)	0,522

n: Nombre de souches

4 CONCLUSION

L'étude est la première en Côte d'Ivoire, relative à la virulence des espèces de *Aeromonas* sp. isolées de la grenouille comestible. Les grenouilles fraîches vendues sur les marchés sont contaminées par des espèces de *A. hydrophila* et *A. sobria* potentiellement pathogènes. Par contre, la viande de grenouille séchée est exempte de *Aeromonas* sp. Compte tenu du fait que la viande de grenouille joue un rôle important dans la nutrition humaine, des mesures d'hygiène doivent être adoptées par les collecteurs, les vendeurs et les consommateurs afin de protéger la santé du consommateur et ces bénéfiques. Par ailleurs, il est recommandé aux consommateurs de faire sécher la viande de grenouille avant toute consommation ou d'acheter la viande de grenouille sous sa forme fumée afin de réduire le risque de toxi-infection.

REFERENCES

- [1] Alperi, A. J. Martínez-Murcia, W. C. Ko, A. Monera, M. J. Saavedra. Figueras M.J. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 60, pp. 2048-2055, 2010.
- [2] C. Harf-Monteil, H. Monteil. *Aeromonas*. Précis de la bactériologie clinique; vol. 2, pp. 1167-1175, 2007.
- [3] A. Sarkar, M. Saha, P. Roy. Identification and Typing of *Aeromonas Hydrophila* through 16S rDNA-PCR Fingerprinting, *AquacultRes*, vol. 3, no 6, pp. 4, 2012.
- [4] K. Sen, M. Rodgers. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 97, pp. 1077-1086, 2004.
- [5] M. J. Janda, S. L. Abbott. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *CLIN. MICROBIOL. REVI*, vol. 3, no 1, pp.35-73, 2010.
- [6] I.H. Igbinosa, A. I. Okoh. Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *J. Basic Microb*, vol. 53, no 11, pp. 895-901, 2013.
- [7] Q. Zhang, G. Q. Shi, G. P. Tang, Z. T. Zou, G. H. Yao, G. Zeng. A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, *WPSAR*, vol. 3, no 4, pp. 1-5, 2012.
- [8] M. Dwivedi, A. Mishra, A. Prasad, A. Azim, R. K. Singh, A. K. Baronia, K. N. Prasad, U. N. Dwivedi. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal Carriers. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 12, no 6, pp.547-548, 2008.
- [9] R. Forbes Mark, L. David, McRuer, L. Rutherford, Pamela. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in relation to timing and duration of breeding in three species of Ranid frog. *Ecoscience*; vol.11, no 3, pp. 282-285, 2004.
- [10] S. Mailafia. Epidemiology and molecular characterization of *aeromonas* species isolated from fishes, poultry and diarrhoeic patients in Zaria, PhD thesis, Ahmadu Bello University Zaria Nigeria, pp. 210, 2005.

- [11] A. Rahouma, J. D. Klena, Z. Krema, A. A. Abobker, K. Treesh, E. Franka, O. Abusnena, H. I. Shaheen, H. El Mohammady, A. Abudher, K. S. Ghenghesh. Enteric pathogens associated with childhood diarrhea in Tripoli-Libya, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 84, no6, pp. 886-891, 2011.
- [12] W. K. M. Mahdi, M. A. M. Esmail, Abo-Ouf Al, S. S. A. Raheem. Study of *Aeromonas*-Associated Gastroenteritis in Children in El-Minia Governorate, *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, vol. 17, no 2, pp. 241-247, 2008.
- [13] M. Mohneke, A. B. Onadeko, M. Hirschfeld, M. O. Rödel. Exploitation of frogs a review with a focus on West Africa. *SALAMANDRA*, vol. 47, pp. 125-132, 2009.
- [14] B. Tohé, N. G. Kouamé, N. E. Assemian, G. Gourène, M.O. Rödel. Dietary Strategies of the Giant Swamp Frog *Hoplobatrachus occipitalis* in Degraded areas of Banco National Park (Ivory Coast). *International Journal of Scientific Research and Reviews*, vol. 3, no 2, pp. 34-46, 2014.
- [15] M. Hirschfeld, M.O. Rode. The diet of the African Tiger Frog, *Hoplobatrachus occipitalis*, in northern Benin, *SALAMANDRA*, vol. 47, 125-132, 2011.
- [16] Leminor,
- [17] A. Hadeel, A. Majeed. Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from patients with Diarrhea, *Journal of Kerbala University*, vol. 9, no 3, pp. 33-42, 2011.
- [18] H. Natiq, K. Al-Fatlawy, H. Aziz, AL-Hadrawy. Isolation and Characterization of *A. hydrophila* from the Al-Jadryia River in Baghdad (Iraq), *American Journal of Educational Research*, vol. 2, no 8, pp. 658-66, 2014.
- [19] L.B. Anguita, L.B. Rodriguez-Aparicio, G. Naharro. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, pp. 2411-2417, 1993.
- [20] R. Shome, B. R. Shome, N. Ram. Study of virulence factors of *Aeromonas hydrophila* isolates causing acute abdominal dropsy and ulcerative diseases in Indian major carps. *Indian J. Fish.*, vol. 46, no 2, pp.133-140, 1999.
- [21] M. J. Mauel, L. D. Miller, S. F.Kendall, II. M. E. Hines. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana castesbeiana*). *J Vet diagn invest.*, vol. 11, pp. 431-433, 2002.
- [22] R. Tiberti. Widespread bacterial infection affecting *Rana temporaria* tadpoles in mountain areas, *Acta Herpetologica*, vol. 6, no 1, pp. 1-10, 2011.
- [23] D. W. Hird, S. L. Diesch, R. G. McKinnell, E. Gorham, F. B. Martin, S. W. Kurtz, C. Dubrovlny. *Aeromonas hydrophila* in wild-caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. *American Association for Laboratory Animal Science*, pp.166-169, 1981.
- [24] D. Mccurdy, K. krum. prevalence of *aeromonas hydrophila* in frogs and toads at the Pierce Cedar Creek Institute, final urge report to the pierce cedar creek institute, pp. 10, 2005.
- [25] B. Adebayo-Tayo, F. Adeyemi, O. Odeniyi, K. Olaseinde. Mycoflora, Mycotoxin contamination and proximate mineral composition of smoke-dried frog (*Aubria* sp.) (*Konko*) sold in Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 3, no 11, pp 894-903, 2015.
- [26] WHO, 2004. Waterborn zoonoses: identification, causes and control. London: IWA Publishing, 2004.
- [27] L. Gorski, C. T. Parker, A. Liang, M.B. Cooley, M.T. Jay-Russell, A.G. Gordus. Prevalence, distribution, and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no 8, p. 2734-48, 2011.
- [28] G. H. Dar, S. A. Dar, A.N. Kamili, Z.C. Mohammad. Detection and characterization of potentially pathogene *Aeromonas sobria* isolated from fish *Hypophthalmichthys molitrix* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Microbial Pathogenesis*, vol. 91, pp.136-140, 2016.
- [29] A. A. Adingra¹, T. Gore B1¹, M. C. Ble1^{et} M. Dosso. Evaluation de la charge bacterienne chez le tilapia *Oreochromis niloticus* (Linné 1758) vendus sur les marches d'abidjan (Côte d'Ivoire), *Agronomie Africaine*, vol. 22, no 3 : 217 – 225, 2010.
- [30] M.D. Pearson, I. Hirono, T. Aoki, R. Miranda, V. Inglis. Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa*, *Dis Aquat Organ*, vol. 40:185-193, 2000.
- [31] E. Rodrigues, F. J. T. Seixas, S. C. R. P. Mello, A. A, Castagna, M. A. Sousa, U. P. Silva, Frog meat microbiota (*Lithobates catesbeianus*) used in infant food. *Food Sci. Technol, Campinas*, vol. 4, no 34, pp. 51-54, 2014.
- [32] J. O. D. Rossi, L. A. Amaral, A. N. Filho, R. P. Schocken-Iturrino. Bacteria of the genus *Aeromonas* in different locations throughout the process line of beef slaughtering. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*, vol. 101, pp. 125-129, 2006.
- [33] A. Uma, G. Rebecca, S. Meena, K. Saravanabava. PCR detection of putative aerolysin and hemolysin genes in an *aeromonas hydrophila* isolate from infected koi carp (*cyprinus carpio*). *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*, vol. 6, no 1, pp. 31-33, 2010.

- [34] M. Simmaco, M. L. Mangoni, A. Boman, D. Barra, H.G. Boman. Experimental infection of *Rana esculenta* with *Aeromonas hydrophila* : A molecular mechanism for the control of the normal flora. *Scand. J. Immunol*, vol. 48, pp. 357-363, 1998.
- [35] D. C. Woodhams, K. Ardipradja, R. A. Alford, G. Marantelli, L. K. Reinert, L. A. RollinsSmith. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation*, vol. 10, pp. 409-417, 2007.
- [36] E. Schadich. Skin peptide defences of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and new Zealand *litoria* frogs against bacterial dermatosepticemia; Thesis Philosophy in Cellular and Molecular Biology, University of Canterbury, pp.147, 2008.
- [37] F. Lakhal, M. El Bour, B. Balkis, A. El Abed. Etude préliminaire des caractéristiques biochimiques et moléculaires d'*Aeromonas hydrophila* isolées du milieu marin, *Mar. Life*, vol.15, no 1-2 pp. 13-18, 2005.
- [38] C. L. Obi, Ramalivhama, A. Samie, E. O. Igumbor. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolates from stool samples of patients in the Venda region of South Africa, *J HEALTH POPUL NUTR*, vol. 25, no 5, pp. 428-435, 2007.
- [39] D. O. R. Adanir, T. Hulya. Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*) hatchery farm, *Bull Vet Inst Pulawy*, vol. 51, pp. 361-364, 2007.
- [40] K. S. Samal, B. K. Das, B. B. Pal. Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, vol. 3, no 12, pp. 259-267, 2014.
- [41] E. E. Onuk, A. Findik, N. Turk, S. Altun, J. Korun, S. Ozer, M. L. Avsever, A. CIFTCI. Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions, *Revue Méd. Vét*, vol. 164, no 4, pp. 200-206, 2013.
- [42] M. Ashraf. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic aeromonads. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, vol. 1, no 1, pp. 90-95, 2010.
- [43] Z. Aun, A. Alzainy. The occurrence, Hemolytic, cytotoxic activity and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples Baghdad. *The Iraqi J. Vet. Med.* vol. 35, no 2, 123-135, 2011.
- [44] H. Nănescu, A. Israil, C. Cedru, D. Caplan. Hemolytic properties of some *Aeromonas* strains. *Roman Arch Microbiol Immunol*, vol. 51, pp. 147-156, 1992.
- [45] M. A. S. McMahon. The expression of proteinases and haemolysins by *Aeromonas hydrophila* under modified atmospheres. *J. Appl. Microbiol*, vol.89, pp.415-442, 2000.
- [46] V. Youinou. Les aeromonadaceae et leur utilisation en tant qu'indicateurs bactériens en pisciculture d'eau douce. Thèse de doctorat vétérinaire, Université vétérinaire de Nantes, P77, 2005.
- [47] M. Nawaz, S. A. Khan, A. A. Khan, K. Sung, Q. Tran, K. Kerdahi, R. Steele. Detection and characterization of virulence and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol*, vol. 27, pp. 327-331, 2010.