

1990  
E020-DUP-H  
0EL01790  
F  
UNIVERSITE PARIS - SUD

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE  
D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT

ANNEE : 1985 - 1986

Série DOCTORAT n° 23

THESE  
présentée



A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE  
D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT

DE L'UNIVERSITE DE PARIS - SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

MENTION SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Melle DUPRAY Elisabeth

Titre de la thèse : Hétérogénéité phénotypique  
et pouvoir pathogène de Vibrionaceae isolées de zones  
littorales bretonnes

-----  
soutenue le 30 mai 1986

JURY : Président : M. le Professeur GERMAN  
Membres : M. le Professeur BOURLIOUX  
M. le Professeur JOLY  
M. le Professeur CORMIER  
Mme POMMEPUY

IFREMER-DERO/EL



0EL01790

UNIVERSITE PARIS - SUD

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT

ANNEE : 1985 - 1986

Série DOCTORAT n° 23

**T H E S E**

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT

DE L'UNIVERSITE DE PARIS - SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

MENTION SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Melle DUPRAY Elisabeth

Titre de la thèse : Hétérogénéité phénotypique  
et pouvoir pathogène de Vibrionaceae isolées de zones  
littorales bretonnes

---

soutenue le 30 mai 1986

JURY : Président : M. le Professeur GERMAN  
Membres : M. le Professeur BOURLIOUX  
M. le Professeur JOLY  
M. le Professeur CORMIER  
Mme POMMEPUY

Au président et aux membres du jury,

M. le Professeur GERMAN

M. le Professeur BOURLIOUX

M. le Professeur JOLY

Mme POMMEPUY,

que je remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur CORMIER, qui m'a guidée et  
conseillée tout au long de cette étude.

Au personnel du laboratoire de Microbiologie  
Pharmaceutique, mes remerciements.

Ce travail a été réalisé avec le concours financier du  
CNEXO (contrat de bourse n° 83 - 000323).

## P L A N

	<u>Pages</u>
<b>Introduction</b>	1
Etat actuel de la taxonomie des <u>Vibrionaceae</u>	2
<b>ETUDE PHENOTYPIQUE :</b>	
I. <u>Souches étudiées</u>	7
1) origine géographique	7
a) rade de Brest	7
b) baie de St Brieuc	7
c) estuaire de la Vilaine	7
2) techniques de prélèvement et d'isolement	11
a) prélèvements d'eau	11
b) " de sédiments	12
c) " de coquillages	12
3) souches de référence	12
II. <u>Identification présumptive</u>	18
1) principe et méthodologie du système API 20E	18
2) résultats	20
3) discussion	25
4) conclusion	29
III. <u>Etude de la croissance à différentes températures</u>	30
1) matériel et méthodes	31
2) résultats	31
3) discussion	33
4) conclusion	34
IV. <u>Sensibilité au composé vibriostatique O/129</u>	35
1) matériel et méthodes	36
a) méthodes des disques	36
b) concentration minimale inhibitrice	37
2) résultats	38
a) méthodes des disques	38
b) CMI en milieu liquide	39
c) CMI en milieu solide	39
3) discussion	45
4) conclusion	48

	<u>Pages</u>
V. <u>Halophilie et halotolérance</u>	49
1) matériel et méthodes	50
a) milieu liquide	50
b) milieu solide	51
2) résultats	51
a) halophilie	
b) halotolérance	
3) discussion	52
4) conclusion	59
VI. <u>Auxanogramme</u>	62
1) matériel et méthodes	62
2) résultats	64
3) discussion	67
VII. <u>Classification numérique</u>	68
1) principe	69
2) matériel et méthode	71
3) résultats et discussion	73
VIII. <u>Observation d'un caractère instable</u>	79
1) recherche de bactériophages	80
2) recherche de plasmides	82
3) conclusion	83
 <b>ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE HUMAIN</b>	 85
 I. <u>Introduction</u>	 85
A) <u>Vibrionaceae</u> rencontrées en pathologie humaine	85
B) méthodes de mise en évidence d'un pouvoir entéropathogène :	94
1) adhésion cellulaire	94
a) entérocytes de lapin	94
b) cultures cellulaires	94
c) hémagglutination	95
2) toxinogénèse	95
a) modèles animaux	95
b) tests cellulaires	96
c) tests immunologiques	96

	<u>Pages</u>
d) hybridation d'ADN	97
3) invasion cellulaire	97
II. <u>Recherche d'une entérotoxine</u>	99
1) culture de cellules Y <sub>1</sub>	99
2) technique ELISA	101
III. <u>Phénomène de Kanagawa</u>	104
1) matériel et méthode	104
2) résultats et discussion	105
IV. <u>Adhésion cellulaire</u>	107
1) matériel et méthodes	107
2) résultats et discussion	108
V. <u>INVASION CELLULAIRE</u>	110
1) matériel et méthodes	110
2) résultats et discussion	111
VI. <u>Résistance aux antibiotiques</u>	112
1) matériel et méthodes	112
2) résultats et discussion	114
<b>Conclusion</b>	118
<b>Bibliographie</b>	120
Annexe 1	138
Annexe 2	151
Annexe 3	156

## **I N T R O D U C T I O N**



La famille des Vibrionaceae, créée en 1965, par Sebald et Véron, comprend les genres : Vibrio, Aeromonas, Photobacterium, Plesiomonas. L'attention des bactériologistes avait longtemps été centrée sur V. cholerae, du fait de son importance en pathologie humaine, mais la connaissance des bactéries apparentées a évolué rapidement depuis une dizaine d'années, tant sur le plan de la systématique, de l'écologie que du pouvoir pathogène.

Les Vibrionaceae sont des bactéries des écosystèmes hydriques (eau douce, eau salée). Ils peuvent être isolés de l'eau, des sédiments, des poissons, coquillages ou autres animaux. Leur développement est fonction de la température, de la salinité et de la teneur en matière organique. Les comportements apparaissent différents selon les espèces : ainsi une température supérieure à 15° C sera favorable à V. cholerae, V. fluvialis, A. hydrophila, ainsi qu'une salinité faible (< 1,5 ‰), tandis que d'autres espèces comme V. parahaemolyticus, V. vulnificus, supporteront une teneur en NaCl plus élevée (Seidler and Evans, 1984 ; Kaper et coll., 1981 ; Kelly, 1982 ; Kaneko et Colwell, 1973).

V. parahaemolyticus persiste dans les sédiments, lorsque la température de l'eau est inférieure à 14° C, et sa réapparition dans la colonne d'eau est possible lorsque la température s'élève (Kaneko et Colwell, 1973). La colonisation d'éléments du zooplancton, en l'occurrence, de copépodes est réalisée par certaines espèces de Vibrio, par adhésion au niveau de la zone orale et des oeufs (Sochard et coll., 1979; Huq et coll., 1983).

Bien que V. cholerae ait longtemps été considéré comme bactérie strictement humaine, ou tout au moins ayant l'homme comme réservoir, certains auteurs ont montré récemment la présence de

V. cholerae dans des zones pratiquement indemnes de contamination fécale (Colwell et coll., 1981). Ils en concluent que V. cholerae serait un élément de la flore autochtone, au même titre que les autres espèces de Vibrio. Il s'agit là d'un point important pour l'épidémiologie du choléra.

Certaines espèces luminescentes, V. fischeri, P. phosphoreum et P. leiognathi ont été isolés des organes lumineux de poissons.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène, on peut distinguer deux axes : la pathogénicité animale et la pathogénicité humaine. Cette dernière sera développée dans le chapitre "Etude du pouvoir pathogène chez l'homme". Elle est essentiellement représentée par des gastro-entérites et des surinfections. La pathogénicité animale liée aux Vibrionaceae se rencontre notamment chez les poissons, salmonidés (A. salmonicida), anguilles, poissons marins (V. anguillarum, V. ordalii, V. damsela), et les mollusques (V. tubiashii).

#### Etat actuel de la taxonomie des Vibrionaceae :

L'évolution enregistrée ces dernières années dans le domaine de la taxonomie bactérienne est sans aucun doute liée à l'emploi de nouvelles techniques permettant la comparaison des matériels génétiques par hybridation d'ADN, d'ARN. Ces techniques sont le plus souvent associées à l'étude plus classique des caractères phénotypiques.

D'après la dernière édition (1984), du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les caractères généraux des Vibrionaceae sont les suivants : bacilles droits ou en "virgule", à Gram négatif, mobiles par ciliature polaire (en milieu liquide), pouvant développer des flagelles péritriches sur milieu gélosé. Il n'y a pas formation d'endospore. La plupart des espèces sont oxydase positive. Ce sont des bactéries chimio-organotrophes, anaérobies facultatives, à métabolisme fermentatif. Il n'y a pas de dénitrification. Toutes utilisent le D. glucose comme seule source de carbone et d'énergie, et la plupart utilise l'ammonium comme source d'azote.

La composition en bases (guanine et cytosine) de l'ADN varie de 38 à 63 mol%. De nombreuses espèces exigent une concentration en NaCl de 2 à 3 %, ou de l'eau de mer, pour une croissance optimale.

Quatre genres composent cette famille :

- genre Vibrio
- " Photobacterium
- " Aeromonas
- " Plesiomonas.

Les caractères différentiels de ces quatre genres sont indiqués au tableau I.

Tableau I : caractères différentiels au sein des Vibrionaceae  
(d'après le Bergey's Manual, 1984).

Characteristics	<i>Vibrio</i>	<i>Photo- bacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Sheathed polar flagella	+	-	-	-
Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate coupled with the inability to utilize $\beta$ -hydroxybutyrate	-	+		
Na <sup>+</sup> is required for growth or stimulates growth	+	+	-	-
Production of: Lipase	[+] <sup>a</sup>	D	+	-
Utilization of: D-Mannitol	[+] <sup>a</sup>	-	[+]	-
Mol% G + C of DNA	38-51	40-44	57-63	51

<sup>a</sup> Symbols: +, all positive; [+], most positive; -, all negative; D, some species positive, some species negative.

<sup>b</sup> *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, and *V. costicola* are negative for this trait.

<sup>c</sup> *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, and *V. marinus* are negative for this trait.

1) Le genre Vibrio comprend le plus grand nombre d'espèces décrites : 20 sont répertoriées dans le Bergey's Manual, (1984), et 9 espèces ont été décrites depuis :

- |                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| - <u>V. cholerae</u>         | - <u>V. metschnikovii</u> |
| - <u>V. harveyi</u>          | - <u>V. campbellii</u>    |
| - <u>V. parahaemolyticus</u> | - <u>V. alginolyticus</u> |
| - <u>V. natriegens</u>       | - <u>V. vulnificus</u>    |
| - <u>V. nereis</u>           | - <u>V. fluvialis I</u>   |
| - <u>V. splendidus I</u>     | - <u>V. fluvialis II</u>  |
| - <u>V. splendidus II</u>    | - <u>V. pelagius I</u>    |
| - <u>V. nigripulchritudo</u> | - <u>V. pelagius II</u>   |
| - <u>V. anguillarum I</u>    | - <u>V. fischeri</u>      |
| - <u>V. anguillarum II</u>   | - <u>V. logei</u>         |
| - <u>V. proteolyticus</u>    | - <u>V. gazogenes</u>     |
| - <u>V. marinus</u>          | - <u>V. costicola</u>     |

Les caractères différentiels de ces espèces sont reportés dans le tableau I.C (annexe 3).

- V. damsela (Love et coll., 1981)
- V. mimicus (Davis et coll., 1981)
- V. ordalii (Schiewe et coll., 1981)
- V. hollisae (Hickman et coll., 1982)
- V. diazotrophicus (Guérinot et coll., 1982)
- V. aestuarianus (Tison et Seidler, 1983)
- V. orientalis (Yang et coll., 1983)
- V. furnissii (Brenner et coll., 1983)
- V. tubiashii (Hada et coll., 1984)

2) Le genre Photobacterium regroupe 3 espèces :

- P. phosphoreum
- P. leiognathi
- P. angustum

dont les caractères sont reportés dans le tableau II.C (annexe 3).

La luminescence n'est pas un caractère différentiel vis-à-vis des autres genres, puisque seuls P. phosphoreum et P. leiognathi en sont capables, et que certaines souches de V. cholerae, V. harveyi, V. splendidus I, V. fischeri et V. logei présentent ce caractère.

3) Le genre Aeromonas a fait l'objet de nombreuses études taxonomiques. La classification retenue dans le Bergey's Manual est la suivante : on distingue d'une part les espèces mobiles :

- A. hydrophila
- A. caviae
- A. sobria

et d'autre part, A. salmonicida, immobile, composée de 3 sous-espèces :

- A. salmonicida subsp. salmonicida
- " " " achromogenes
- " " " masoucida

Les caractères de ces 4 espèces sont mentionnés dans le tableau III.C (annexe 3).

Une nouvelle espèce a été décrite par Allen et coll. (1983), à laquelle ils ont donné le nom de A. media, et qui est immobile.

4) Le genre Plesiomonas ne compte qu'une espèce, Pl. shigelloides (tableau III.C, annexe 3).

Enfin, des auteurs soviétiques ont proposé récemment la création d'un genre supplémentaire, Allomonas, avec description d'une espèce, A. enterica (Kalina et coll., 1984).

A noter que le genre Beneckeia a été supprimé en 1980 (Baumann et coll.).

L'évolution récente des connaissances concernant cette famille bactérienne nous a amené à étudier de manière attentive les souches de Vibrionaceae isolées d'eau, de sédiments et de moules dans le cadre de campagnes d'étude de différentes zones littorales en Bretagne.

Dans un premier temps, nous évaluerons l'hétérogénéité de cette flore, grâce à une étude phénotypique regroupant 43 caractères de croissance et biochimiques. La classification numérique réalisée à partir de ces données nous permettra également de juger la valeur des résultats obtenus par une micro-méthode d'identification.

Dans un deuxième temps, la recherche d'un éventuel pouvoir pathogène pour l'homme sera entreprise, à l'aide de tests in vitro et chez l'animal.

**ETUDE PHENOTYPIQUE**

## I. SOUCHES ETUDIÉES

### 1. Origine géographique

Nous avons étudié 117 souches bactériennes isolées de différents sites du littoral breton. Il s'agit de la rade de Brest (76 souches), de la baie de Saint-Brieuc (35 souches) et de l'estuaire externe de la Vilaine (6 souches).

#### a) La rade de Brest

La zone étudiée est limitée par l'embouchure de l'Elorn, la plage et le port de plaisance du Moulin Blanc, la zone industrielle portuaire (ZIP), la passe Est du port de commerce et enfin, la presqu'île de Plougastel (carte 1).

Des prélèvements d'eaux de mer et de sédiments ont été effectués dans le cadre de "l'étude de la capacité d'acceptation du milieu marin", campagnes de juin 1980 et mars 1983 (CNEXO Brest).

Le détail des souches isolées, leur point de prélèvement, la date et la nature du prélèvement figure dans le tableau II.

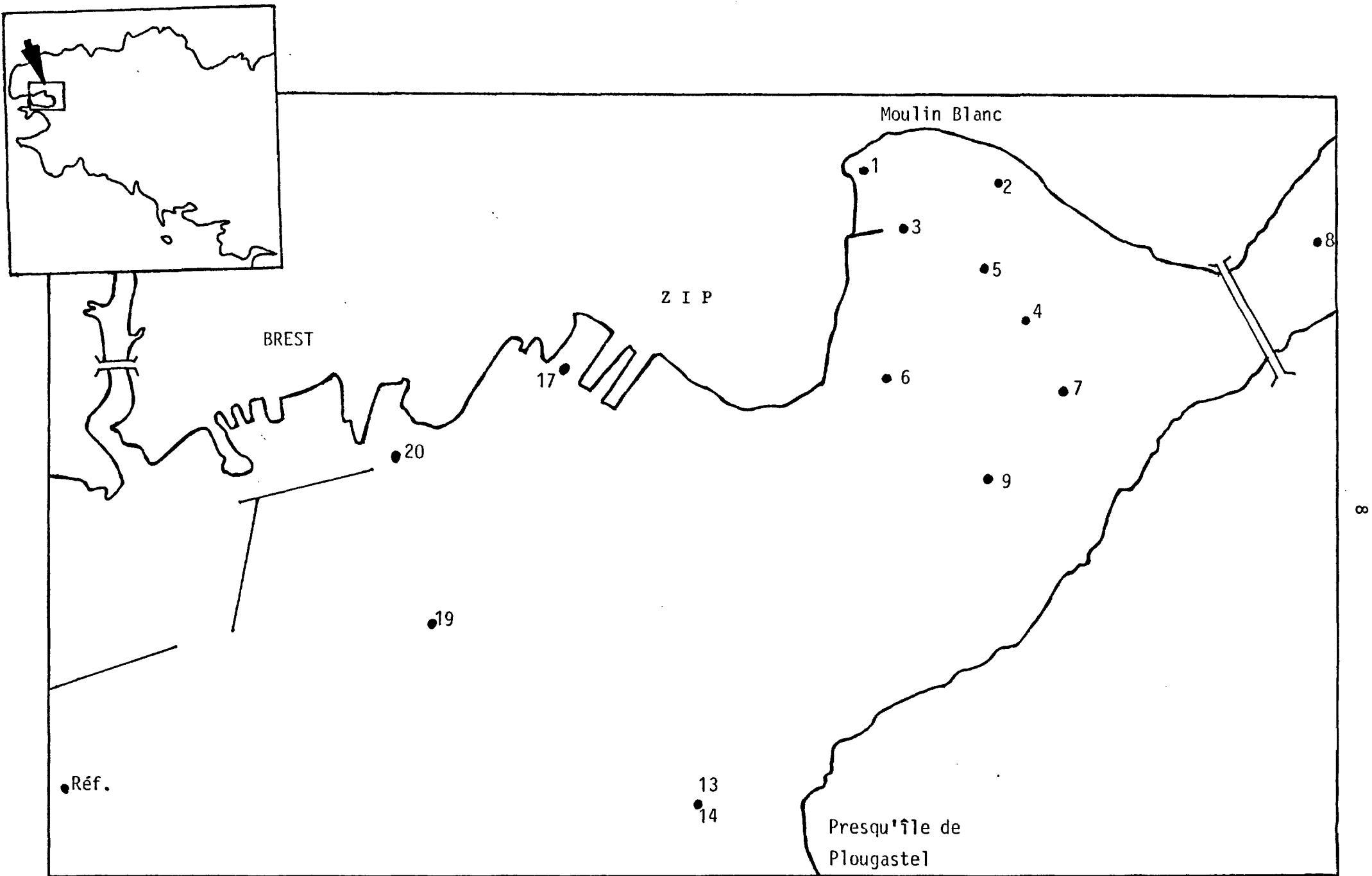
#### b) La baie de Saint-Brieuc

35 souches proviennent de prélèvements d'eau de mer et de moules effectués en baie de Saint-Brieuc, en 1981 et 1982 (tableau III) (L. BUNETEL, DEA microbiologie, 1982) dans le cadre de l'étude d'impact sur l'environnement de l'extension du port du Légué (CNEXO, Brest).

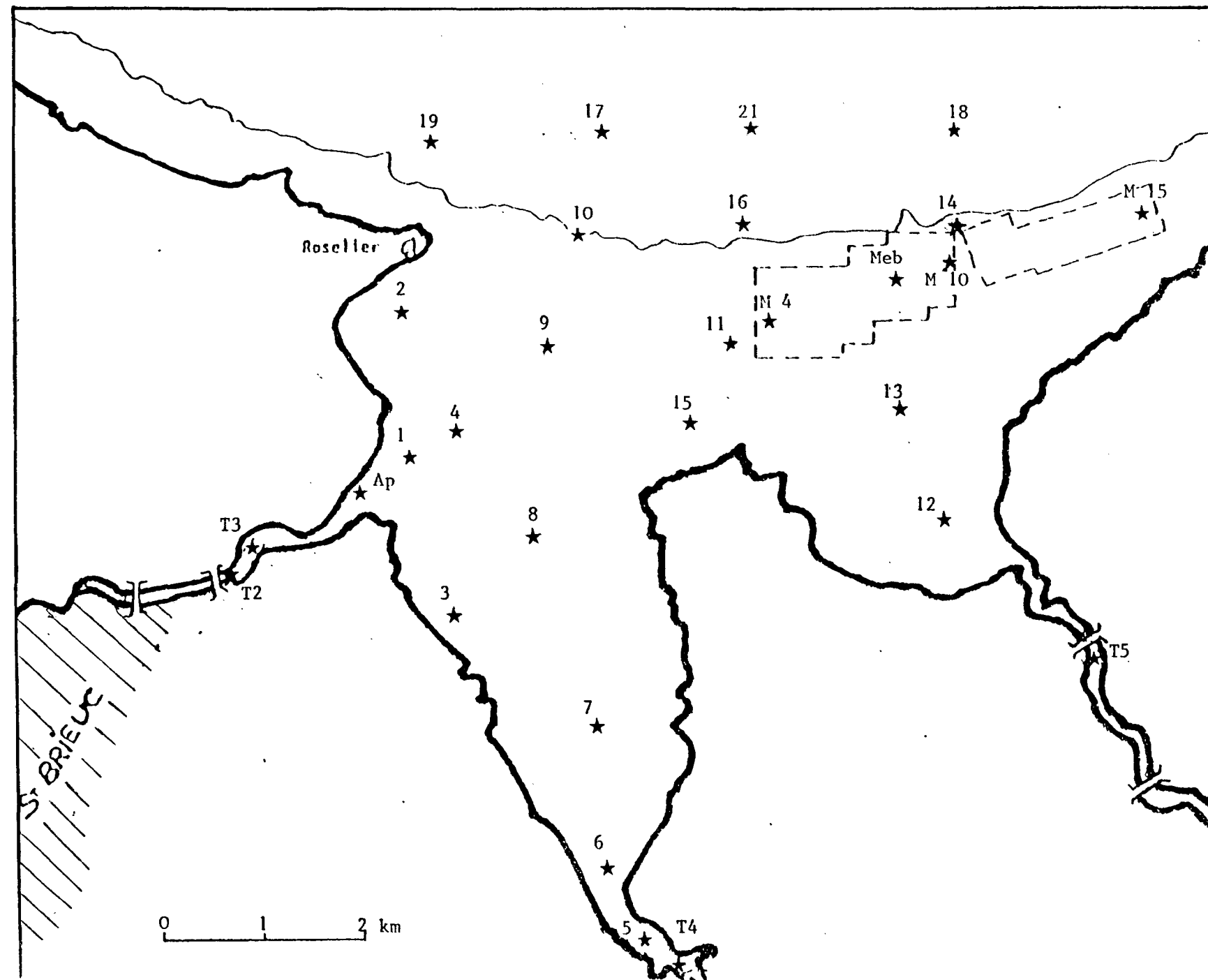
#### c) L'estuaire externe de la Vilaine

Enfin, 6 souches proviennent d'échantillons de moules de bouchots de la baie de Quiberon-Vilaine prélevés durant l'été 1982 (tableau IV).

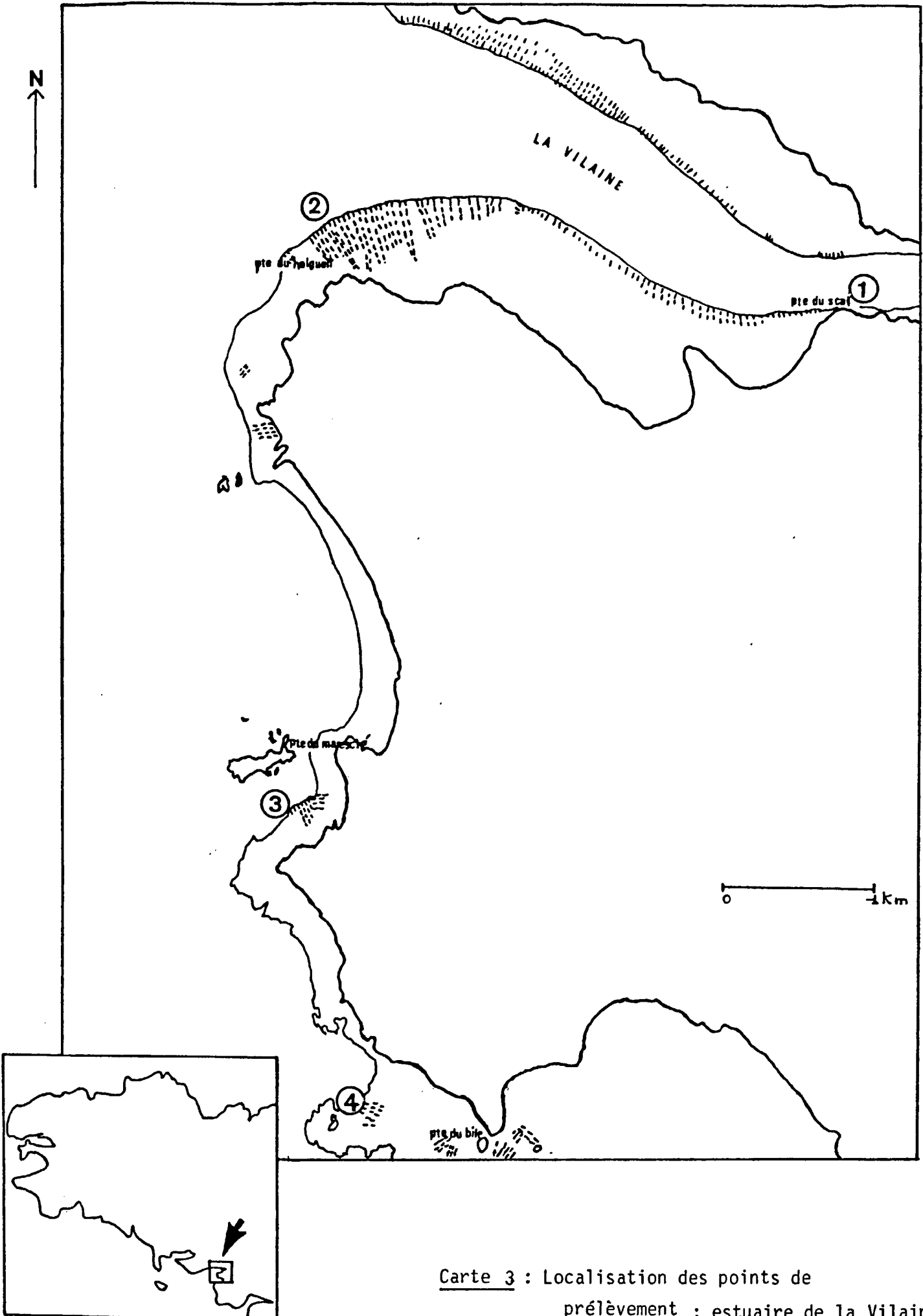




Carte 1 : localisation des points de prélèvement en rade de Brest.



Carte 2 : Localisation des points de prélèvement en baie de Saint-Brieuc.



Carte 3 : Localisation des points de  
prélèvement : estuaire de la Vilaine.

## 2. Techniques de prélèvement et d'isolement

### a) Les prélèvements d'eau

Ils sont réalisés à l'aide de bouteilles stériles d'une capacité de 1 litre. Les échantillons sont acheminés au laboratoire en glacière (4 à 6° C), dans les 3 heures qui suivent.

C'est la méthode de filtration sur membrane qui a été retenue pour le dénombrement et l'isolement des bactéries. Nous avons donc utilisé des rampes de filtration Millipore<sup>R</sup> équipées de filtres cellulose de diamètre de pore 0,22 µm. Les volumes d'eau filtrés variaient de 0,1 à 100 ml en fonction de la charge bactérienne prévisible. Après filtration, la membrane est déposée à la surface d'un milieu gélosé coulé en boîte de Pétri. Les milieux sur lesquels les souches de cette étude ont été isolés sont les suivants :

- milieu trypticase-soja (TD)
- milieu trypticase-soja salé à 4 % (eau de mer) (TS)
- milieu de Drigalski (DD)
- milieu de Drigalski salé à 4 % (DS)
- milieu de Drigalski incubé à 42° C (D42)
- milieu thiosulfate, citrate, bile, saccharose (TCBS)
- milieu de Chapman (Chap)
- milieu de Drigalski à l'ampicilline (5 mg/l) (DA).

Les formules détaillées de ces milieux de culture sont indiquées à l'annexe n° 2.

Selon les milieux, l'incubation est de :

- 3 jours à 25° C : TS, DS, Chap, TCBS
- 48 heures à 37° C : TD, DD, DA
- 24 heures à 42° C : D42

A partir de chaque filtre, 5 colonies prises au hasard sont repiquées sur gélose trypticase-soja salée ou non, selon le milieu d'origine.

b) Prélèvements de sédiments

Ils sont effectués par carottage. L'ensemencement sur gélose est réalisé "au rateau", après dilution en eau à 0,9 % NaCl.

c) Prélèvements de coquillages

Il s'agit essentiellement de moules. 25 grammes de broyat de chair et eau intervalvaire sont ensemencés dans 75 ml de bouillon d'enrichissement (eau peptonée salée, EPS et/ou bouillon glucosé au teepol, GSTB : la composition est indiquée à l'annexe 2. Après 7 heures d'incubation à 37° C, une anse de platine de la culture est repiquée sur milieu TCBS. Les boîtes sont incubées 24 heures à 37° C, et 5 à 10 colonies saccharose (-) sont repiquées sur gélose trypticase-soja à 4 % NaCl (Dupray et Cormier, 1983).

3. Souches de référence

Nous avons inclus dans notre étude phénotypique, 10 souches de différentes espèces de Vibrio et Aeromonas. Elles proviennent, d'une part de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris), d'autre part du Département de Microbiologie de l'Université de Maryland, USA (Prof. R.R. COLWELL).

<u>R.R. COLWELL</u> :	<u>V. mimicus</u>	ATCC 33653	(n° 120)
	<u>V. fluvialis I</u>	2386	(n° 121)
	<u>V. anguillarum I</u>	ATCC 19264	(n° 122)
	<u>V. vulnificus</u>	ATCC 27562	(n° 123)
	<u>V. alginolyticus</u>		(n° 124)

<u>CIP</u> :	<u>V. anguillarum</u>	408	(n° 125)
	<u>V. parahaemolyticus</u>	7063	(n° 126)
	<u>V. anguillarum</u>	5336	(n° 127)
	<u>A. hydrophila</u>	5749	(n° 128)
	<u>V. parahaemolyticus</u>	7330	(n° 129)

Toutes les souches sont conservées sur gélose en pente trypticase-soja, ainsi que sous forme lyophilisée ou en bouillon glycérolé congelé.

TABLEAU II : Origine des souches étudiées

BREST

N°	Point de prélèvement	Milieu d'isolement	Date	Origine
1	19	DS	Juin 80	Eau
2	?	DS	" "	"
3	7	DS	" "	"
4	7	DS	" "	"
5	6	DS	" "	"
6	8	DS	" "	"
7	19	DS	" "	"
8	2	DS	" "	"
9	19	DS	" "	"
10	3	DS	" "	"
11	6	DS	" "	"
12	19	DS	" "	"
13	7	DS	" "	"
14	17	DS	" "	"
15	3	DS	" "	"
16	20	DS	" "	"
17	9	DS	" "	"
18	9	DS	" "	"
19	17	DS	" "	"
20	3	DS	" "	"
21	9	DS	" "	"
22	20	DS	" "	"
23	4	DS	" "	"
24	14	DS	" "	"
25	17	DS	" "	"
26	6	DS	" "	"
27	6	DS	" "	"
28	20	DS	" "	"
29	6	DS	" "	"
30	3	DS	" "	"
31	19	DS	" "	"
32	17	DS	" "	"
33	20	DS	" "	"
34	2	DS	" "	"
35	17	DS	" "	"
36	9	DS	" "	"
37	4	DS	" "	"
38	6	DD	" "	"
39	8	DD	" "	"
43	2	DD	" "	"
44	19	DD	" "	"
45	20	DD	" "	"
47	20	DD	" "	"
49	14	DD	" "	"
50	8	D42	" "	"

51	3	DD	"	"	"
52	17	D42	"	"	"
53	2	DD	"	"	"
54	4	DD	"	"	"
55	2	DD	"	"	"
56	4	DD	"	"	"
57	20	DD	"	"	"
58	5	DD	"	"	"
59	K04	DS	"	"	Sédiment
60	K04	DS	"	"	Sédiment
61	K04	DS	"	"	Sédiment
62	R39	DS	"	"	égout
63	R39	DS	"	"	"
64	R39	DS	"	"	"
65	R39	DS	"	"	"
66	K56	D42	"	"	Sédiment
74	47A	Chap	"	"	eau
104	48C	Chap	"	"	"
105	34C	Chap	"	"	"
106	34B	Chap	"	"	"
107	34D	Chap	"	"	"
108	39C	Chap	"	"	"
109	11A	Chap	"	"	"
111	19	DS	"	"	"
112	17	TCBS		3/83	"
113	8	TCBS		2/83	"
115	8	TCBS		"	"
116	8	TCBS		"	"
117	8	TCBS		"	"
118	2	D42		11/80	"
119	1	D42		12/80	"



TABLEAU III : Origine des souches étudiées

## ST BRIEUC

N°	Point de prélèvement	Milieu d'isolement	Date	Origine
40	T5	DA	1982	eau
41	16	DA	"	"
42	9	DD	"	"
46	Dy	DA	"	"
73	4	TCBS	"	"
75	4	TCBS	"	"
76	11	DD	"	"
77	4	TD	"	"
78	10	DA	"	"
79	14	DD	"	"
80	16	DA	"	"
81	1	TCBS	"	"
82	4	DD	"	"
83	T5	DA	"	"
84	11	DA	"	"
85	14	TD	"	"
86	15	DD	"	"
87	16	DA	"	"
88	14	DA	"	"
89	21	DA	"	"
90	Meb	DD	1981	Moules
91	15	DD	1981	eau
92	1	DA	1982	"
93	9	TD	"	"
94	14	DA	"	"
95	12	DA	"	"
96	13	DD	"	"
97	14	TCBS	"	"
98	T4	TS	"	"
99	Fy	TCBS	"	"
100	T4	TCBS	"	"
101	Ap	TCBS	1981	"
102	M10	Chap	1981	Moules
103	M4	DD	"	"
110	M15	DD	"	"

TABLEAU IV : Origine des souches étudiées

## VILAINNE

N°	Point de prélèvement	Milieu d'isolement	Date	Origine
67	2	TCBS	7/1982	Moules
68	1	TCBS	"	"
69	1	TCBS	"	"
70	4	TCBS	"	"
71	1	TCBS	"	"
72	2	TCBS	"	"

## II. IDENTIFICATION PRESOMPTIVE

Toutes nos souches présentent certains caractères communs, disons d'orientation diagnostique. Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies-anaérobies facultatifs, présentant une réaction d'oxydase positive, et mobiles. Ces caractères de base nous ont fait placer ces souches dans la famille des Vibrionaceae (Bergey's Manual of systematic bacteriology, 1984).

Nous avons ensuite utilisé une micro-méthode d'identification biochimique : galeries API 20E (API System, La Balme-Les Grottes, France), pour l'identification présomptive des souches isolées.

### 1. Principe et méthodologie du système API 20E :

Il s'agit de la miniaturisation d'une galerie classique d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles Gram négatif. La galerie API 20E est constituée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés dissous lors de l'addition d'une suspension bactérienne. Les métabolites produits sont mis en évidence par des réactions colorées, ou par addition de réactifs, après 24 heures d'incubation à 37° C.

Les tests biochimiques présents sur les gammes API 20E sont les suivants :

- hydrolyse de l'ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside (ONPG)
- hydrolyse de l'arginine (ADH)
- décarboxylation de la lysine (LDC)
- " de l'ornithine (ODC)
- utilisation du citrate de sodium (Simmons)
- production d'H<sub>2</sub>S
- présence d'une uréase
- présence d'une tryptophane-désaminase (TDA)

- production d'indole
- production d'acétoïne : réaction de Voges-Proskauer (VP)
- liquéfaction de la gélatine
- fermentation de différents sucres :
  - . glucose
  - . mannitol
  - . inositol
  - . sorbitol
  - . rhamnose
  - . saccharose
  - . mélibiose
  - . amygdaline
  - . L + arabinose
- réduction des nitrates.

L'ensemencement des galeries a été réalisé selon le protocole suivant :

A partir d'une colonie d'une culture pure sur gélose trypticase-soja, on prépare une suspension en eau salée de 8,5 g/l de NaCl. Nous avons employé ce type de diluant plutôt que l'eau distillée recommandée par le fabricant, car il était probable que certaines souches seraient halophiles strictes, donc nécessitant NaCl pour leur croissance.

La suspension bactérienne est répartie dans les cupules selon les instructions du fabricant. L'incubation a lieu pendant :

. 24 heures à 37° pour les souches provenant d'un milieu "doux" : TD, DD, DA,

. 48 heures à 25° C pour les souches isolées sur un milieu "salé" : TS, DS, TCBS, Chapman.

Les résultats (+ ou -) obtenus peuvent être codés numériquement en profil de 7 chiffres selon le principe suivant : on attribue aux tests positifs une valeur de 1, 2, ou 4 :

ONPG		ADH		LDC	
ODC		Cit		H <sub>2</sub> S	
Ure		TDA		Ind	
VP	(1)	Gel	(2)	Glu	(4)
Man		Ino		Sor	
Rha		Sac		Mél	
Amy		Ara		Ox	

et au tests négatifs, la valeur 0. Pour chaque ligne du tableau ci-dessus, on obtient un chiffre compris entre 0 et 7, somme des codes de chaque test. Le profil numérique obtenu est alors comparé à la liste des taxons qui constitue la base de données API établie après étude de nombreuses souches de collection et "sauvages".

Il faut noter que la réaction d'oxydase est prise en compte dans le profil numérique mais que la réaction de réduction des nitrates ne l'est pas.

## 2. Résultats

Le détail des résultats figure dans le tableau IA (annexe 1). N'y sont pas reportés les tests pour lesquels toutes les souches donnent un résultat négatif : production d'H<sub>2</sub>S et présence d'une tryptophane désaminase (TDA), ainsi que les tests de fermentation du glucose et du mannitol, positifs pour l'ensemble des souches.

L'identification numérique repose sur le calcul de la fréquence d'apparition du profil de la bactérie étudiée dans chacun des taxons de la base de données.

TABLEAU V : Identification des souches étudiées,  
d'après le catalogue analytique API 20E.

n° Souche	Profil numérique API	Identification	% d'identification
1	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
2	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
3	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
4	0 044 124	P. multocida	94,8
5	4 357 125	Pas d'identification	-
6	4 147 125	V. alginolyticus/V. cholerae	66,7/32,4
7	4 145 124	V. alginolyticus	91,5
8	4 147 127	Pas d'identification	-
9	4 047 124	V. alginolyticus	96,3
10	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
11	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
12	3 247 526	A. hydrophila	99,9
13	4 147 125	V. alginolyticus/V. cholerae	66,7/32,4
14	4 047 124	V. alginolyticus	96,3
15	4 357 124	V. alginolyticus	92
16	4 347 125	V. alginolyticus/V. cholerae	64,7/34,2
17	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
18	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
19	4 046 124	V. alginolyticus	99,2
20	4 146 124	V. alginolyticus	91,7
21	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
22	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
23	4 147 324	Pas d'identification	-
24	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
25	4 046 324	Pas d'identification	-
26	4 344 124	V. alginolyticus	97,7
27	4 144 124	V. alginolyticus	97,8
28	4 145 125	V. alginolyticus	91,1
29	4 145 125	V. alginolyticus	91,1
30	4 344 124	V. alginolyticus	97,7
31	4 147 125	V. alginolyticus/V. cholerae	66,7/32,4
32	4 047 124	V. alginolyticus	96,3
33	4 346 106	V. parahaemolyticus	99,9
34	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
35	4 145 124	V. alginolyticus	91,5
36	4 145 124	V. alginolyticus	91,5
37	4 144 164	Pas d'identification	-
38	3 047 126	A. hydrophila	99,9
39	1 044 127	Pas d'identification	-
40	3 044 126	A. hydrophila	99,7
41	3 045 506	Pas d'identification	-
42	3 044 127	A. hydrophila	99,9
43	3 047 526	A. hydrophila	99,9
44	3 044 127	A. hydrophila	99,9
45	3 044 127	A. hydrophila	99,9
46	3 047 526	A. hydrophila	99,9
47	3 047 127	A. hydrophila	99,9

n° Souche	Profil numérique API	Identification	% D'identification
49	3 045 126	A. hydrophila	99,9
50	3 044 726	Pas d'identification	-
51	3 045 527	Pas d'identification	-
52	3 047 526	A. hydrophila	99,9
53	3 045 127	A. hydrophila	99,9
54	2 047 524	Pas d'identification	-
55	3 046 524	A. hydrophila	99,9
56	4 146 125	V. alginolyticus	90,5
57	3 047 527	A. hydrophila	99,9
58	3 047 526	A. hydrophila	99,9
59	4 146 125	V. alginolyticus	90,5
60	4 144 124	V. alginolyticus	97,8
61	4 146 124	V. alginolyticus	91,7
62	4 045 125	Pas d'identification	-
63	4 144 124	V. alginolyticus	97,8
64	4 144 124	V. alginolyticus	97,8
65	4 144 124	V. alginolyticus	97,8
66	4 144 125	V. alginolyticus	96,9
67	4 145 105	V. parahaemolyticus	
68	4 345 105	V. parahaemolyticus	97,0
69	4 347 105	V. parahaemolyticus	
70	4 145 104	V. parahaemolyticus	93,1
71	4 147 105	V. parahaemolyticus	85,6
72	4 146 106	V. parahaemolyticus	99,9
73	4 145 124	V. alginolyticus	91,5
74	4 146 124	V. alginolyticus	91,7
75	4 147 324	Pas d'identification	-
76	3 044 126	A. hydrophila	99,7
77	3 047 526	A. hydrophila	99,9
78	3 047 526	A. hydrophila	99,9
79	3 047 134	A. hydrophila	99,9
80	1 046 124	V. cholerae/A. hydrophila	49,9/44,9
81	4 145 124	V. alginolyticus	91,5
82	3 047 524	A. hydrophila	99,9
83	3 045 524	Pas d'identification	-
84	3 046 124	A. hydrophila	99,9
85	3 007 524	Pas d'identification	-
86	3 044 127	A. hydrophila	99,9
87	3 046 127	A. hydrophila	99,9
88	3 047 526	A. hydrophila	99,9
89	3 045 524	Pas d'identification	-
90	3 046 526	A. hydrophila	99,9
91	3 045 526	Pas d'identification	-
92	1 047 524	Pas d'identification	-
93	3 047 124	A. hydrophila	99,9
94	3 047 526	A. hydrophila	99,9
95	3 047 126	A. hydrophila	99,9
96	5 045 127	Pas d'identification	-
97	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
98	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6

n° Souche	Profil numérique API	Identification	§ D'identification
99	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
100	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
101	3 047 524	A. hydrophila	99,9
102	4 146 124	V. alginolyticus	91,7
103	3 046 127	A. hydrophila	99,9
104	4 146 124	V. alginolyticus	91,7
105	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
106	4 345 124	V. alginolyticus	90,9
107	4 145 125	V. alginolyticus	91,1
108	4 144 125	V. alginolyticus	96,9
109	4 347 125	V. alginolyticus/V. cholerae	64,7/34,2
110	3 046 127	A. hydrophila	99,9
111	4 147 124	V. alginolyticus/V. cholerae	67,1/32,6
112	4 146 124	V. alginolyticus	91,7
113	0 044 524	P. multocida	99,8
115	0 044 524	P. multocida	99,8
116	0 044 524	P. multocida	99,8
117	0 044 524	P. multocida	99,8
118	0 044 124	P. multocida	94,8
119	1 044 124	P. multocida	92,4
120	5 146 104	V. cholerae	81,2
121	3 046 126	A. hydrophila	99,9
122	3 047 525	A. hydrophila	99,9
123	5 146 105	V. vulnificus	96,4
124	4 047 124	V. alginolyticus	96,3
125	3 247 527	A. hydrophila	99,9
126	4 346 104	V. parahaemolyticus	97,7
127	3 247 525	A. hydrophila	99,9
128	3 246 126	A. hydrophila	99,9
129	4 146 106	V. parahaemolyticus	99,9



Trois cas peuvent se présenter, lors de l'interprétation :

- si le pourcentage d'identification est supérieur ou égal à 80, l'identification est faite au taxon,

- si le pourcentage d'identification est inférieur à 80, on somme les pourcentages d'identification des 2 ou 3 premiers taxons. Si cette somme est supérieure ou égale à 80 %, 3 éventualités sont possibles :

- . l'identification se fait au stade de l'espèce,
- . l'identification se fait au stade du genre,
- . la discrimination est insuffisante entre 2 ou 3 espèces ou genres, et des caractères complémentaires sont proposés pour leur différenciation.

- si la somme des pourcentages d'identification est inférieure à 80, l'identification n'est pas acceptée.

L'examen des profils biochimiques obtenus donne les résultats suivants, d'après le catalogue analytique API 20E : tableau V.

Au total, sur 117 souches, 60 appartiendraient au genre Vibrio, 31 au genre Aeromonas, 7 au genre Pasteurella et 19 sont d'identification incertaine (tableau VI).

Identification	Nombre de souches	nombre de profils
- <u>Vibrio alginolyticus</u>	31	11
- <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	7	7
- <u>Aeromonas hydrophila</u>	31	15
- <u>Pasteurella multocida</u>	7	3
- discrimination insuffisante entre : <u>V. cholerae</u> et <u>V. alginolyticus</u>	22	3
<u>V. cholerae</u> et <u>A. hydrophila</u>	1	1
- pas d'identification	18	17

Tableau VI : Récapitulatif des identifications

Les caractères complémentaires permettant la discrimination entre V. cholerae, V. alginolyticus et A. hydrophila, sont, toujours d'après le catalogue API :

	Sérologie	NaCl 6,5 %	RM	O/129
<u>V. cholerae</u>	+	0 %	95 %	S
<u>V. alginolyticus</u>	-	99 %	0 %	S
<u>A. hydrophila</u>	-			R

Aucune des souches de discrimination insuffisante entre V. cholerae et V. alginolyticus n'est agglutinable par le sérum polyvalent anti-O<sub>1</sub>.

En ce qui concerne l'identification des souches de référence que nous avons incluses dans notre étude, on remarque que :

- V. mimicus est assimilé à V. cholerae,
- V. fluvialis et V. anguillarum sont assimilés à A. hydrophila,
- V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus et A. hydrophila sont correctement identifiés.

On note que seules 3 souches ont un code identique à celui de V. alginolyticus (n° 124) de référence, et 1 souche le même que V. parahaemolyticus CIP 7330 (n° 129).

### 3. Discussion

Bien qu'il s'agisse d'un système d'identification adapté plus particulièrement à l'étude des Enterobacteriaceae, les galeries API 20E fournissent une clé d'identification de quelques espèces appartenant à la famille des Vibrionaceae (V. cholerae, V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. vulnificus, A. hydrophila, P. shigelloides).

Sur 117 souches étudiées, 76, soit 65 % sont assimilables à une espèce bactérienne, alors que 23, soit 19,66 %, sont d'identification incertaine, et 18 (15,4 %) ne correspondent à aucun profil de la liste API des taxons possibles.

L'identification des P. multocida ne prend pas en compte l'étude de la mobilité, qui d'après le Bergey's Manual (1984) est négative pour le genre Pasteurella. Or, toutes nos souches sont mobiles, et nous rejetons donc cette identification. Les 7 souches concernées sont considérées non identifiées.

L'emploi de galeries API 20E pour l'identification de bactéries hétérotrophes marines est jugé satisfaisant par Gauthier et Clément (1978), tout au moins en utilisant un milieu de salinité moyenne (1,4 %) et de pH neutre. Cependant, seules 3 souches de Vibrionaceae ont été testées dans cette étude. Les conditions d'utilisation sont assez proches des nôtres, puisque notre inoculum était réalisé en eau salée à 0,9 %. Les caractères les plus discordants par rapport à une méthode classique sont, d'après ces auteurs (pour les Vibrio), l'ODC et la fermentation du mannitol.

Dans une autre étude consacrée à l'influence de la composition du milieu utilisé sur les réactions biochimiques en galerie API 20E, Mac Donnell et coll. (1982) recommandent un milieu salé à 2 % (eau de mer), pour l'identification de bactéries marines.

Il semblerait que cette concentration ionique soit optimale pour l'activité enzymatique des bactéries testées, appartenant à la famille des Vibrionaceae et des Pseudomonadaceae. Toutefois, certaines espèces, comme V. cholerae et A. hydrophila, ne sont pas influencées par la composition en sels du milieu d'ensemencement, dans l'expression de leurs caractères biochimiques. Ce sont surtout Photobacterium phosphoreum et Allomonas qui nécessitent une concentration en sels supérieure à 0,85 %.

Maugeri et coll. (1983) modifient également le milieu d'ensemencement de façon à obtenir une salinité de 2 à 3 ‰, pour l'identification de V. anguillarum. Comme ces auteurs, nous constatons que les souches de référence V. anguillarum que nous avons étudiées sont identifiées comme A. hydrophila par le code API. Maugeri et coll. préconisent de ce fait, l'étude préliminaire de la mobilité et de la sensibilité au composé vibriostatique O/129.

Le problème de la validité de l'identification des bactéries d'origine marine par le système API 20E a été évoqué par de nombreux auteurs. Ainsi, Seidler et coll. (1980) ont montré la similitude des profils biochimiques de Aeromonas et des Vibrios du groupe F (V. fluvialis), ce qui est confirmé dans notre étude. Ils recommandent l'étude du besoin en NaCl comme test de différenciation.

Une étude sur V. damsela constate que les profils numériques obtenus en API 20E donnent une identification "Pseudomonas sp du groupe fluorescent" (Clarridge et Zigelboim-Daum, 1985).

David et Sizemore (1981) rapportent également le cas de bactéries identifiées comme A. hydrophila en API 20E, mais ayant une composition du DNA en guanine et cytosine (G + C ‰) comprise entre 40 et 49 mol ‰ (le genre Aeromonas est caractérisé par un G + C ‰ de 57 à 63 (Bergey's Manual)).

Il semble donc nécessaire de confirmer l'identification présomptive par des tests complémentaires, tels que la sensibilité au O/129, l'halophilie, l'auxanogramme des sources de carbone (West and Colwell, 1984).

Si l'on se réfère au Bergey's Manual, on s'aperçoit que l'éventualité d'appartenance de nos souches au genre Photobacterium est éliminée, du fait de la fermentation du mannitol par toutes nos souches. Il en est de même pour le genre Plesiomonas regroupant des bactéries qui possèdent une arginine-déshydrogénase, ainsi qu'une lysine et ornithine décarboxylases, ce qui est le cas d'aucune de nos souches.

Remarque :

La dernière édition (7/1985) du catalogue analytique API 20E apporte un certain nombre de modifications dans les profils numériques, par rapport à l'édition que nous avons utilisée. Dix espèces de Vibrionaceae, contre 6 auparavant, sont répertoriées :

<u>A. hydrophila</u>	<u>V. fluvialis</u>
<u>A. salmonicida</u>	<u>V. metschnikovii</u>
<u>Pl. shigelloides</u>	<u>V. mimicus</u>
<u>V. alginolyticus</u>	<u>V. parahaemolyticus</u>
<u>V. cholerae</u>	<u>V. vulnificus</u>

D'après ce nouveau catalogue analytique, 23 de nos souches voient leur identification modifiée :

n° souches	Ancienne identification	nouvelle identification
53, 82, 101	<u>A. hydrophila</u>	Pas d'identification
87, 103, 110	" "	Discrimination insuffisante entre <u>A. hydrophila</u> et <u>V. fluvialis</u>
40, 42, 44, 45, 76, 86, 90	" "	<u>V. fluvialis</u>
67, 68, 69, 71	<u>V. parahaemolyticus</u>	Pas d'identification
15, 28, 29, 107	<u>V. alginolyticus</u>	" "
119	<u>P. multocida</u>	Discrimination insuffisante entre <u>P. multocida</u> et <u>V. fluvialis</u>
39	Pas d'identification	<u>V. fluvialis</u>

Les souches de référence, V. mimicus et V. fluvialis sont correctement identifiées. Les 3 V. anguillarum sont identifiées comme A. hydrophila. Tandis que A. hydrophila n'est identifié que jusqu'au stade d'une discrimination insuffisante entre V. fluvialis et A. hydrophila.

Ces modifications sont certainement dues au mode de calcul statistique employé pour la détermination des espèces, ainsi qu'à l'hétérogénéité des souches intégrées dans la banque de données. Il faut également noter qu'un seuil de 80 % d'homologie est appliqué pour qu'un profil figure dans le catalogue analytique comme identification recevable.

Les tables permettant la discrimination entre A. hydrophila et V. fluvialis d'une part, et P. multocida et V. fluvialis d'autre part sont les suivantes :

	flagelles	croissance à 42 ° C	O/129
A. hydrophila	1 polaire	V	R
V. fluvialis	latéraux	+	S

	D-xylose	mobilité
P. multocida	+ -	0
V. fluvialis	-	50 %

Nous discuterons de ces modifications ultérieurement, lors de la classification numérique.

#### 4. Conclusion

L'utilisation d'une microméthode pour l'identification de souches de la famille des Vibrionaceae était pour nous séduisante. En effet, les avantages sont évidents, en gain de temps et de manipulations. Le choix du milieu d'ensemencement était délicat car nous ne connaissions ni l'halophilie probable, ni l'halotolérance de nos souches. C'est pourquoi nous avons utilisé une salinité de 0,85 % intermédiaire. Les identifications obtenues grâce au code API ne sont considérées que comme présomptives au vu des réserves émises dans la littérature et du nombre restreint de taxons identifiables.

Une erreur flagrante est celle des souches identifiées comme P. multocida, mais mobiles, et que nous considèrerons comme "non identifiées".

Nous avons donc voulu confirmer ce diagnostic par des tests phénotypiques complémentaires :

- sensibilité au O/129,
- halophilie et halotolérance,
- croissance à différentes températures,
- auxanogramme,

qui seront détaillés dans les chapitres suivants.

### III. ETUDE DE LA CROISSANCE A DIFFERENTES TEMPERATURES

L'étude de la croissance à différentes températures est un test classique des études phénotypiques bactériennes. A côté de l'observation d'une culture à des températures "extrêmes", on peut déterminer la température optimale de croissance. Différentes classes ont été ainsi définies (d'après Véron, 1982) :

- bactéries cryophiles : optimum inférieur à 5° C
- bactéries psychrophiles : optimum inférieur à 20° C
- bactéries mésophiles : optimum compris entre 25° et 45° C
- bactéries thermophiles : optimum supérieur à 45° C.

Les techniques les plus couramment utilisées pour étudier l'influence de la température sur la croissance des Vibrionaceae font appel à la culture en eau peptonée (Tison et coll., 1982; Lee et coll., 1981), ou en bouillon nutritif (Popoff et Véron, 1976; Baumann et coll., 1971; Kelly, 1982; Colwell, 1970; Schiewe et coll. 1981). L'ensemencement sur gélose est beaucoup moins employé (Pacha et Kiehn, 1969).

## 1. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé une technique en milieu liquide, c'est-à-dire en eau peptonée à 1 %, salée à 1 %, pH 7. L'emploi de plaques de microtitration comportant 96 puits a permis un gain de temps et de manipulation par rapport à un système classique.

Le protocole est le suivant :

A partir de bouillons de 18 heures en eau peptonée ( $10^9$  bactéries/ml) réalisés en microplaque, un inoculateur multi-points automatique (Dynatech) ensemence une autre microplaque à raison de 1  $\mu$ l environ pour chaque puits de 50  $\mu$ l d'eau peptonée. 4 microplaques sont ainsiensemencées et incubées respectivement à 4, 25, 37 et 42° C. La lecture se fait macroscopiquement par appréciation du trouble, après un délai d'incubation de 24 heures pour les températures de 25, 37 et 42° C, et de 10 jours pour 4° C.

## 2. Résultats

Toutes les souches étudiées se développent tant à 25° C qu'à 37° C, en eau peptonée. Le détail des résultats obtenus pour les températures de 4 et 42° C figure dans le tableau IIA (annexe 1).

. On remarque que 11 souches, soit 9,4 % peuvent se développer dans un domaine étendu de températures : de 4 à 42° C. Il s'agit principalement d'Aeromonas (6 souches), ainsi que de 3 souches non identifiées et de 2 Vibrios (figure 1).

. A l'inverse, 24 souches, soit 20,5 % ne poussent ni à 4° C, ni à 42° C. Ce sont 11 souches d'Aeromonas, 9 souches non identifiées, 2 V. alginolyticus et 1 V. parahaemolyticus.

. Les souches poussant de 4° C à 37° C sont au nombre de 17, soit 14,53 %. Ce sont des Aeromonas pour plus de la moitié (10 souches) et 7 souches non identifiées.



Nombre de souches

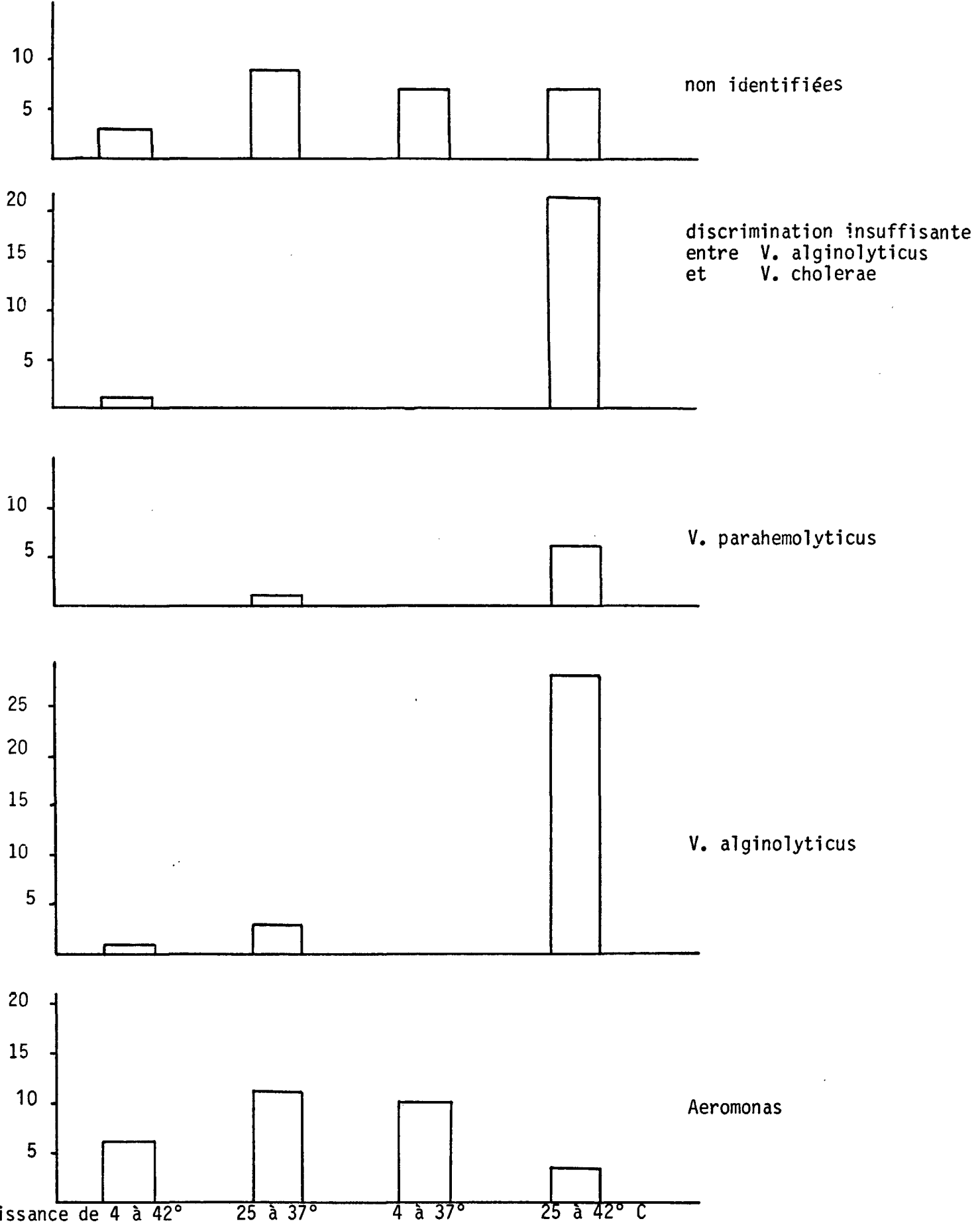


Figure 1 : répartition des souches en fonction de leur domaine de températures de croissance.

. En revanche, les 65 souches du quatrième groupe, c'est-à-dire se développant de 25 à 42° C, appartiennent en majorité au genre Vibrio (28 V. alginolyticus, 21 de discrimination insuffisante entre V. alginolyticus et V. cholerae, et 6 V. parahaemolyticus). 7 souches non identifiées et 3 Aeromonas en font également partie.

. En ce qui concerne les souches de référence, on note que V. fluvialis, V. vulnificus et V. alginolyticus se développent, ni à 4° C, ni à 42° C. A. hydrophila est capable, quant à lui, de croissance à ces 2 températures. Enfin, V. mimicus et V. paraheamolyticus se développent de 25 à 42° C, alors que V. anguillarum ne pousse que de 4 à 37° C.

### 3. Discussion

La croissance des bactéries à différentes températures, notamment "extrêmes", toutes proportions gardées, est un caractère très souvent retenu mais qui s'inscrit dans un ensemble de caractères. Si l'on se réfère au Bergey's Manual (1984), on constate que la majorité des 20 espèces décrites de Vibrio ne se développe pas à 4° C, exceptés V. logei et V. marinus et avec plus de variations, V. nereis, V. splendidus I et V. pelagius I et II. Ceci est à rapprocher de nos résultats, puisque seulement 3,33 % des Vibrio présentent une croissance à 4° C.

A une température de 35° C, V. splendidus II, V. nigripulchritudo, V. anguillarum II, V. logei et V. marinus ne se développent pas. Enfin, à 43° C, seuls V. cholerae, V. paraheamoliticus, V. alginolyticus et V. vulnificus sont capables de croître, les résultats pouvant être variables pour les autres espèces de Vibrio susceptibles d'être isolées en bactériologie clinique (Bergey's Manual). La forte proportion de Vibrio capables de croître à 42° C observée dans notre étude ne nous permet pas toutefois de confirmer ou non l'identification présumptive.

On remarque, d'autre part, qu'aucun Vibrio identifié comme V. alginolyticus n'a les mêmes exigences de température que la souche de V. alginolyticus de référence. Quant aux V. parahaemolyticus, 6 souches sur 7 se comportent comme les souches de référence.

En ce qui concerne les bactéries du genre Aeromonas, Popoff (Bergey's Manual) les décrit comme ayant une croissance variable à 5° C, A. salmonicida ne se développant pas à 37° C, en bouillon nutritif. Enfin, la croissance à 43° C est variable selon les espèces.

La diversité des types d'exigences de température rencontrée dans notre étude pour les supposés Aeromonas est à rapprocher des résultats d'une étude de Rouf et Rigney (1971). En effet, ces auteurs ont déterminé la température minimale et maximale de croissance de 10 souches d'A. hydrophila : 0 à 15° C pour les minimales, 40 à 55° C pour les maximales, certaines se développant de 0 à 55° C, d'autres de 10 à 40° C seulement. Quant à A. salmonicida, les températures compatibles avec une croissance vont de 5 à 45° C : cette température maximale étant en contradiction avec celle mentionnée dans le Bergey's Manual.

La répartition des souches non identifiées est également très homogène entre les différents domaines de température compatibles avec une croissance.

#### 4. Conclusion

Cette étude de la croissance à différentes températures n'apporte pas en elle-même d'éléments décisifs. Les résultats observés seront inclus dans l'étude phénotypique regroupant 43 caractères décrits dans les chapitres suivants. Toutefois, le fait que toutes les souches se développent à 37° C est un premier élément dans l'évaluation d'un éventuel pouvoir pathogène humain.

IV. SENSIBILITE AU COMPOSE VIBRIOSTATIQUE O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl ptéridine) :

C'est en 1950 que Collier, Campbell et Fitzgerald ont les premiers montré l'effet inhibiteur de certains dérivés de la ptéridine, et notamment de la 2,4-diamino-6,7-diisopropyl ptéridine (O/129) sur la croissance de V. cholerae. Ces travaux ont été par la suite étendus à d'autres genres bactériens. Ainsi, Shewan et coll. (1954) ont proposé un schéma de différenciation basé sur la sensibilité des bactéries du genre Vibrio et la résistance du genre Pseudomonas au O/129.

Depuis, ce test est employé couramment pour séparer, au sein de la famille des Vibrionaceae, le genre Aeromonas, résistant, des genres Vibrio et Plesiomonas, sensibles (Richard et coll., 1978).

Enfin, certains auteurs le recommandent pour différencier, d'une part, les genres Pasteurella et Actinobacillus, des Enterobacteriaceae, d'autre part (Chatelain et coll., 1979) ; ainsi que les genres Staphylococcus et Micrococcus (Bouvet et coll., 1982).

En ce qui concerne les techniques utilisées, la majorité des auteurs emploient la méthode de diffusion en gélose, ou méthode des disques, mais la charge en O/129 des disques est très variable.

Furniss et coll. (1978) recommandent l'utilisation de disques de O/129 chargés de 10 µg et 150 µg, permettant une répartition des souches en "sensibles" et "partiellement sensibles" au sein même du genre Vibrio :

<u>Disques à 150 µg</u>	<u>Disques à 10 µg</u>	<u>interprétation</u>
Pas de zone d'inhibition	Pas de zone d'inhibition	→ Résistant
Zone d'inhibition	Pas de zone d'inhibition	→ Partiellement sensible
Zone d'inhibition	Zone d'inhibition	→ Sensible

D'autres techniques ont été proposées, comme le dépôt d'un cristal de O/129 directement à la surface d'une gélose ensemencée (Kaper et coll., 1981; Oliver et coll., 1983) et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide (Lee et coll., 1978a).

D'autre part, Merkel (1972) a montré l'influence de la teneur en sels minéraux du milieu de culture utilisé, sur l'activité du O/129: des concentrations en NaCl supérieures à 0,1M et en MgCl<sub>2</sub> supérieures à 0,025M inhibent l'action du composé vibriostatique.

## 1. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé 2 méthodes pour la recherche de la sensibilité de nos souches au O/129. Tout d'abord, une technique de diffusion en gélose, avec deux types de disques commercialisés, puis la détermination de la CMI en milieu solide et liquide.

### a. Méthode des disques

Le protocole d'ensemencement est identique à celui d'un antibiogramme par "inondation" : une à deux colonies sont émulsionnées dans 3 ml d'eau peptonée à 1 % NaCl, et on en reprend 3 gouttes dans 5 ml d'une solution de NaCl à 0,9 %. Cette dilution sert à "inonder" la gélose de façon à recouvrir complètement la surface. Le milieu employé est le Heart Infusion Agar (DIFCO) (annexe n° 2).

Après élimination de l'excès de liquide et séchage de la gélose, on dépose un disque au centre de la boîte.

Nous avons employé deux types de disques :

- disques imprégnés de O/129 commercialisés par l'Institut Pasteur Production (réf. 53.872) dont la charge n'est pas connue.

- Comprimés de 150 µg de O/129 : "diagnostic tablets" (ROSCO).  
L'excipient utilisé est du sulfate de baryum.

Après dépôt du disque ou du comprimé, les boîtes sont mises à incuber 18 heures à 30° C (recommandation de l'IPP) et l'on mesure le diamètre de la zone d'inhibition de la culture apparue autour du disque.

Remarque :

Les milieux de culture recommandés par les deux fabricants sont respectivement :

- le milieu de Müller-Hinton (IPP)
- le milieu CM 55 (OXOID)

dont les compositions sont proches de celle du milieu HIA que nous avons employé (annexe n° 2).

b) CMI : concentration minimale inhibitrice

. Milieu liquide

A partir d'une solution-mère aqueuse de phosphate de O/129 (SIGMA) stérilisée par filtration sur membrane Millipore<sup>R</sup> de porosité 0,22 µm, on réalise une gamme de dilutions sériées de raison 2, double concentration, en eau peptonée salée à 1 %. Les concentrations finales testées sont les suivantes : 480 ; 240 ; 120 ; 60 ; 30 ; 15 ; 7,5 ; 3,75 ; 1,87 µg/ml ainsi qu'un témoin de croissance.

L'ensemencement se fait de la façon suivante : pour chaque souche, on ensemence une eau peptonée de 2 ml, salée à 1 %, que l'on incube 4 heures à 37° C de façon à obtenir une culture en phase exponentielle de croissance ( $10^6$  bactéries/ml). 50 µl de ce bouillon

sont alors répartis dans chacun des puits correspondants à la gamme de 0/129. Les microplaques ainsi ensemencées sont placées 24 heures à l'étuve à 37° C. On détermine pour chaque souche la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la première concentration où aucun trouble n'est observé à l'oeil nu, indiquant l'absence de croissance bactérienne.

#### . Milieu solide

Le principe est le même, mais l'on emploie un milieu gélosé renfermant des concentrations croissantes de 0/129.

A partir d'une solution-mère aqueuse de 0/129, on réalise des dilutions, de façon à obtenir les concentrations finales suivantes (volume final de 50 ml de chaque boîte) : 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 640 µg/ml de 0/129 ainsi qu'une boîte témoin sans 0/129.

Ces solutions sont incorporées après stérilisation de la gélose, en l'occurrence le milieu HIA, au moment de couler les boîtes de Pétri (format 12 x 12 cm).

Chaque boîte est ensuite ensemencée à l'aide d'un inoculateur multi-points automatique (Dynatech) permettant d'inoculer 96 souches sur une même boîte. Un système automatique d'aiguilles (au nombre de 96) plonge dans une microplaque contenant une culture en eau peptonée salée à 1 %, de 96 souches différentes, puis, après translation, dépose à la surface d'une gélose, une goutte de chacun des bouillons. La lecture se fait macroscopiquement après 24 heures d'étuve à 37° C, et on détermine pour chaque souche, la concentration minimale inhibitrice.

## 2. Résultats

### a. Méthode des disques :

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés sont reportés dans le tableau III.A (annexe 1). Toutes les souches présentant un

diamètre nul avec les disques IPP, ont le même comportement avec les comprimés ROSCO (exception souche n° 58).

Lorsqu'une zone d'inhibition est observée, on note, pour une même souche, une discordance entre les diamètres obtenus avec les 2 types de disques (figure 2 et 3). Pour la majorité des souches (77 %), les diamètres obtenus avec les comprimés ROSCO sont supérieurs à ceux obtenus avec les disques IPP (en tenant compte d'une erreur de lecture de  $\pm 1$  mm), 5 sont identiques et 7, inférieurs de 1 mm (figure 4). Seules 4 souches présentent un diamètre supérieur avec les disques IPP (n° 20, 25, 36 et 117).

D'autre part, le détail des résultats des CMI observées est reporté dans le tableau IIIA (annexe 1), en milieu solide et liquide. Les figures 5 et 6 permettent de visualiser la répartition des souches étudiées en fonction de leur CMI. On observe pour chacune des 2 techniques employées une distribution bimodales des souches :

b) CMI en milieu liquide :

La première population présente des CMI inférieurs ou égales à 120  $\mu\text{g/ml}$ , avec un maximum à 15 et 30  $\mu\text{g/ml}$ . Ce sont des Vibrio qui la composent en majorité, ainsi que 12 souches non identifiées et une souche d'Aeromonas (n° 101).

La deuxième population est représentée par des souches ayant une CMI supérieure ou égale à 240  $\mu\text{g/ml}$ . Elle est constituée essentiellement d'Aeromonas, ainsi que de 14 souches non identifiées, et d'un Vibrio (n° 66).

c) CMI en milieu solide :

On observe également 2 populations, mais moins distinctement. La première a une CMI inférieure ou égale à 240  $\mu\text{g/ml}$ , et est composée de Vibrio, de 14 souches non identifiées, mais également de 4 Aeromonas (n° 12, 84, 87 et 101).



nombre de souches

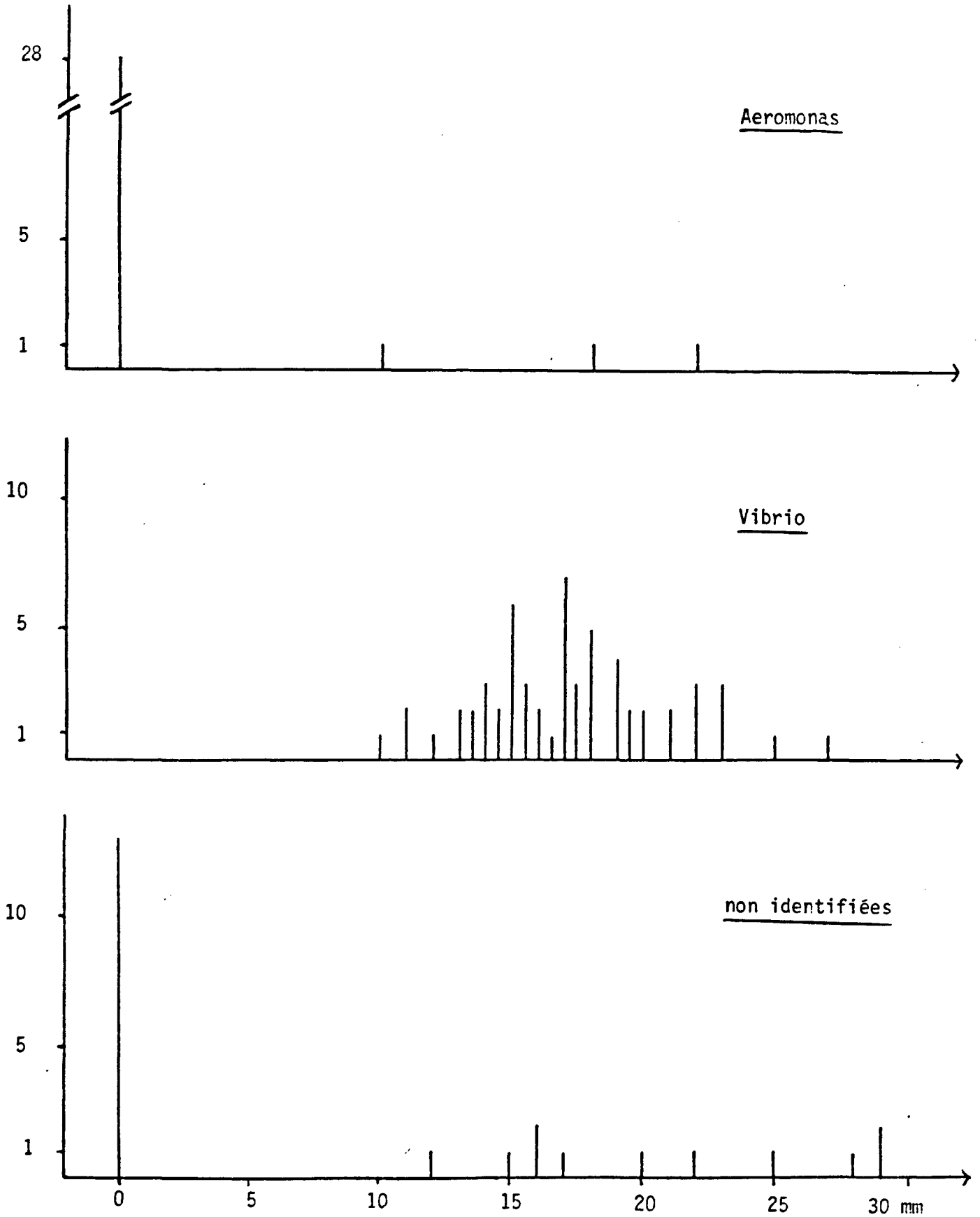


Figure 2 : Distribution des souches en fonction du diamètre de la zone d'inhibition obtenue avec les disques de 0/129 Institut Pasteur Production.

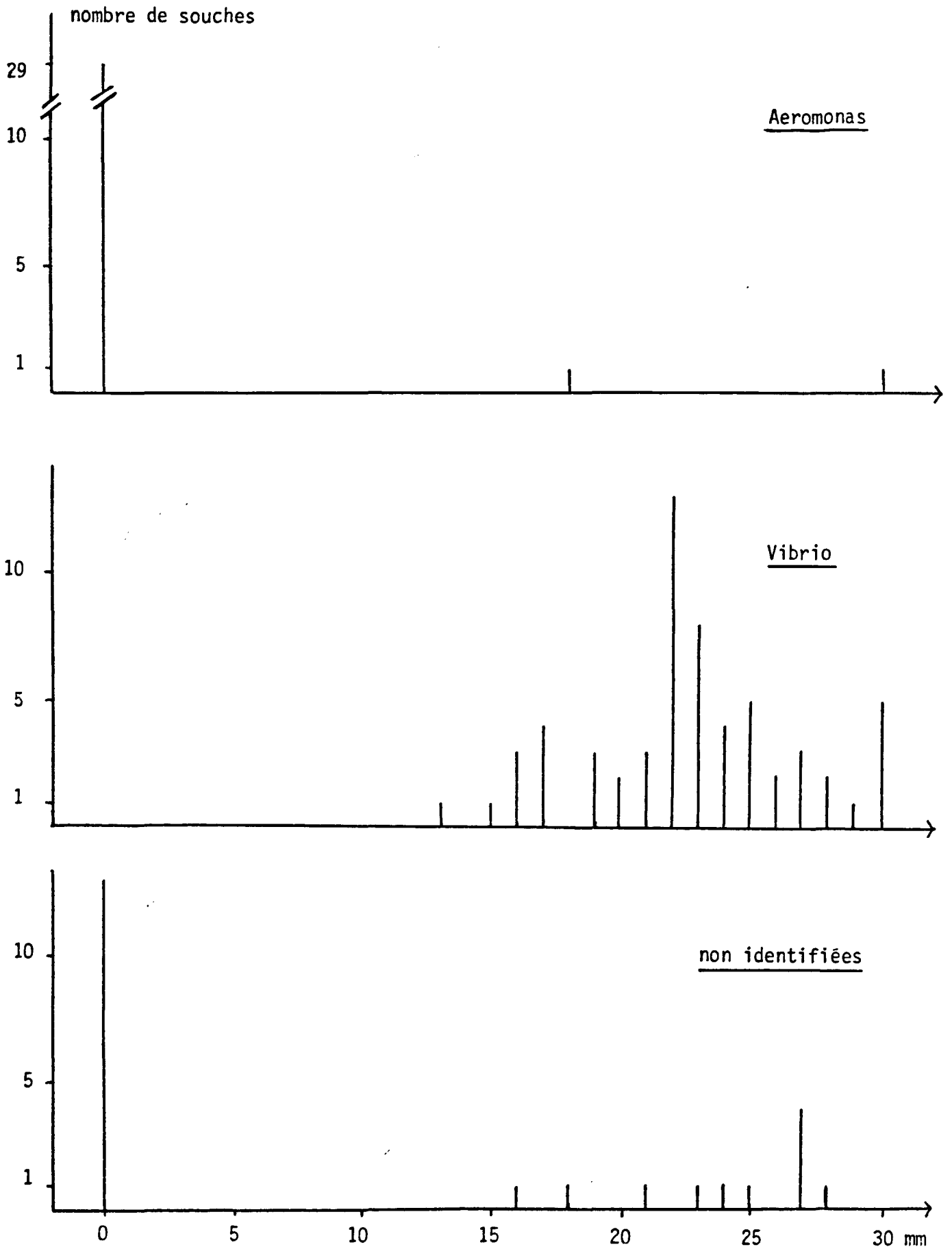


Figure 3 : Distribution des souches en fonction du diamètre de la zone d'inhibition obtenue avec les disques de 0/129 ROSCO.

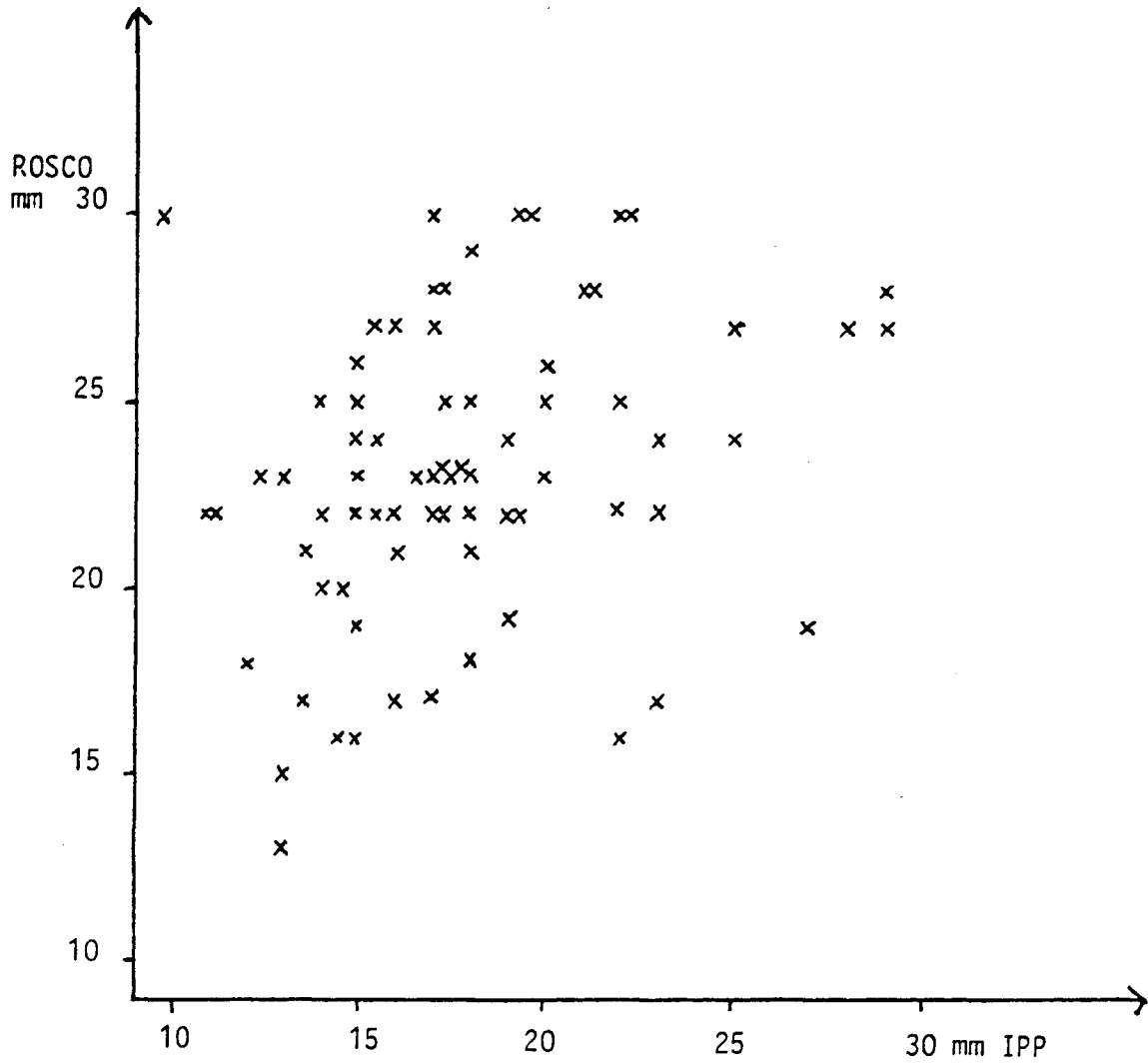


Figure 4 : Corrélation, pour chaque souche, entre les diamètres de la zone d'inhibition obtenue avec les disques IPP et les comprimés ROSCO.

Nombre de souches

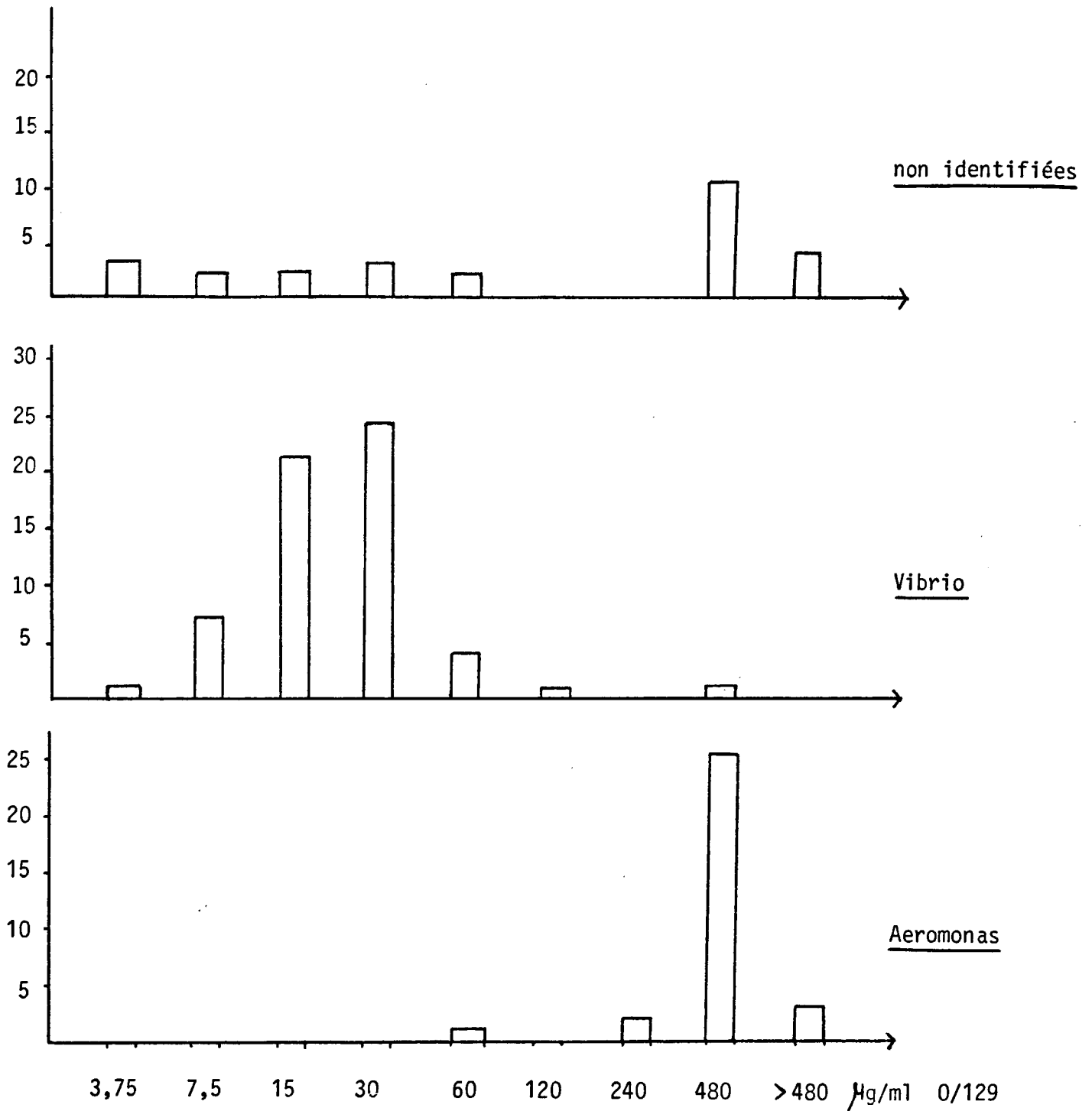


Figure 5 : répartition des souches étudiées en fonction de leur CMI en milieu liquide.

Nombre de souches

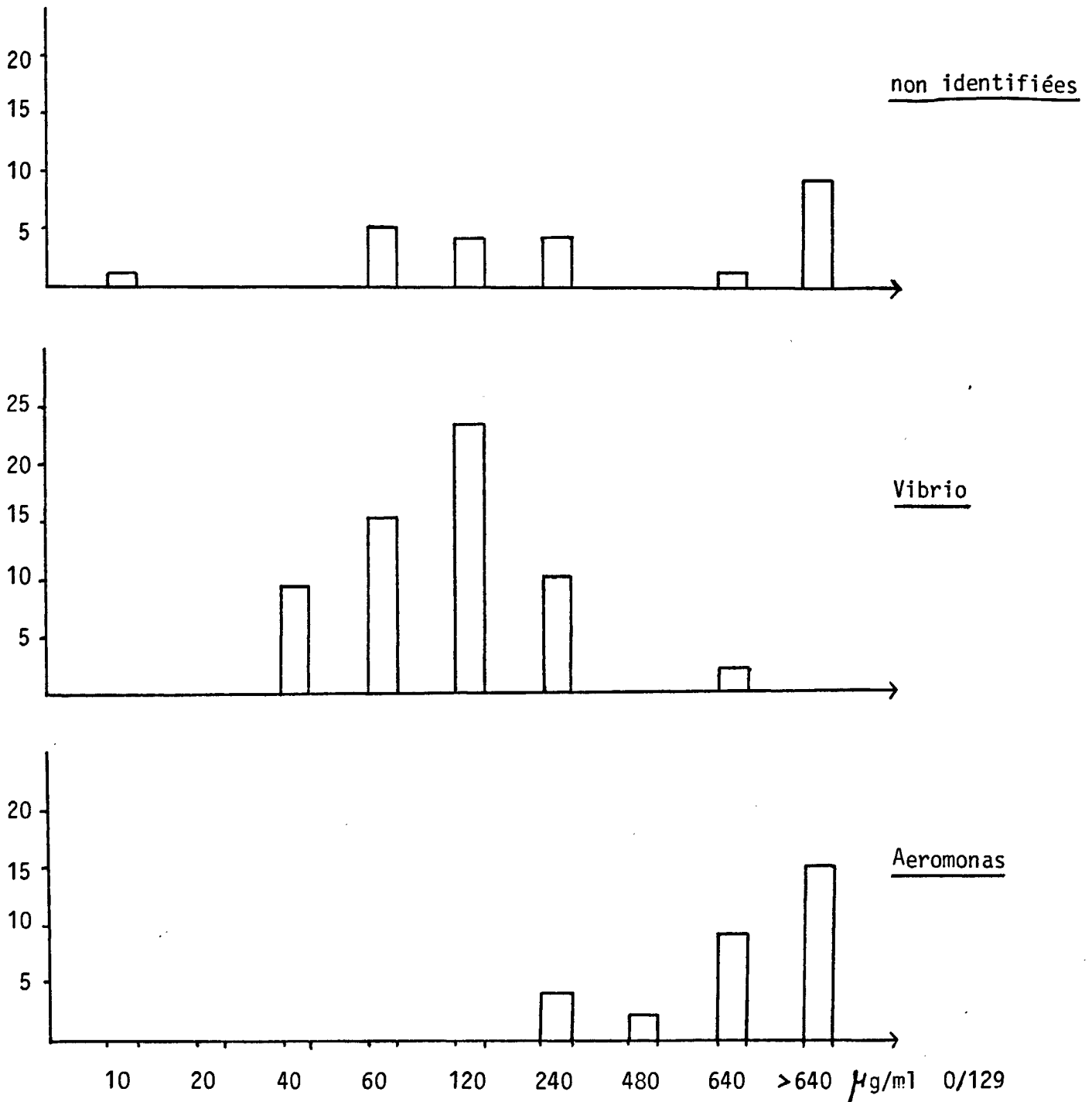


Figure 6 : répartition des souches étudiées en fonction de leur CMI en milieu solide.

La deuxième population est formée de souches d'Aeromonas, de 10 souches non identifiées et de 2 Vibrio (n° 26 et 27), toutes ayant une CMI supérieure ou égale à 480 µg/ml.

### 3. Discussion

Bien que recommandé et utilisé depuis de nombreuses années, le test au O/129 n'a été que peu codifié. A l'origine, Shewan et coll. (1954) employaient une solution aqueuse saturée de composé vibriostatique, sans autre précision. Ensuite, de nombreux auteurs confectionnent eux-mêmes des disques imprégnés d'une solution aqueuse ou cétonique de O/129 réalisant des charges variables (Schiewe et coll., 1981; Davis et coll., 1981; Watkins et Cabelli, 1985). Les diamètres limites des zones d'inhibition ne sont que rarement mentionnés (Richard et coll., 1978).

Si l'on examine la distribution des souches (Vibrio, Aeromonas et non identifiées) pour chaque diamètre d'inhibition (figures 2 et 3), on s'aperçoit que l'on peut fixer une valeur de diamètre critique, séparant les souches en sensibles et résistantes. Pour les disques IPP, le diamètre critique est fixé à 10 mm :

- la majorité des Aeromonas et 13 souches non identifiées sont alors résistantes,

- la totalité des Vibrio est sensible, ainsi que 3 Aeromonas (n° 58, 12 et 101), et 9 souches non identifiées.

On note la même répartition des souches lorsque les comprimés ROSCO sont utilisés : le diamètre critique peut cependant être fixé ici à 15 mm. L'écart enregistré entre les 2 techniques pourrait être dû à la différence de charge en O/129 des 2 types de disques, puisque la charge des disques IPP est inconnue. Mais on constate, sur la droite de corrélation (figure 4), que le nuage de points n'est pas distribué selon une droite parallèle à la bissectrice des coordonnées.

Il n'existe donc pas d'écart stable entre les diamètres : la charge des disques IPP serait variable. Le mode de fabrication de ces disques de papier imprégnés apparaît d'ailleurs plus aléatoire que celui des comprimés.

La souche n° 80 serait donc un Aeromonas, la discrimination étant entre V. cholerae et A. hydrophila en code API.

En accord avec Lee et coll., (1978), l'emploi de disques ou comprimés chargés à 150 µg de O/129 apparaît raisonnable en routine, pour séparer Aeromonas et Vibrio.

En ce qui concerne l'étude des concentrations minimales inhibitrices, la technique en milieu solide est moins discriminante que celle en milieu liquide pour le partage des souches en populations "résistante" et "sensible". La différence observée entre milieu liquide et milieu solide serait due à une mauvaise diffusibilité du composé vibriostatique au sein de la gélose. Les seules CMI mentionnées dans la littérature sont celles de Lee et coll., (1978). Ayant étudié 487 souches de Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas et "Beneckea", ils les répartissent en 3 groupes :

- Sensibles : CMI 1-5 µg/ml
- Partiellement sensibles : CMI 10-50 µg/ml
- Résistantes : CMI supérieure ou égale à 320 µg/ml.

Cette dernière valeur est proche des concentrations critiques que nous pouvons fixer à la suite de notre étude :

- Supérieure ou égale à 240 µg/ml : milieu liquide
- Supérieure ou égale à 480 µg/ml : milieu solide ,

pour délimiter d'une part le groupe de souches sensibles (CMI inférieures), et d'autre part, la population résistante (CMI supérieures).

La taille de chaque population est sensiblement la même pour chaque technique :

- Souches sensibles : 71 (liquide)  
75 (solide)
- Souches résistantes : 42 (liquide)  
38 (solide)

étant entendu que les souches non testées par l'une ou l'autre technique ont été éliminées.

L'étude de la relation CMI/diamètre d'inhibition peut se traduire par l'établissement d'une droite de concordance, ou de régression, comme dans le cas des antibiotiques. Il s'est révélé difficile dans notre étude, de tracer une telle droite, les valeurs des diamètres pour une même CMI étant très dispersées (écart maximum de 10 à 15 mm).

Globalement, les souches considérées résistantes par la méthode des disques s'avèrent résistantes également par l'étude de leur CMI, dans le cadre des concentrations critiques fixées (cf. plus haut). Font exceptions les souches n° 80, 84, 87 et 95 considérées sensibles en CMI milieu solide uniquement.

A l'inverse, seules 4 souches désignées sensibles par la méthode des disques se montrent :

- Résistantes en CMI liquide : n° 12 et 66
- Résistantes en CMI solide : n° 26 et 27

L'identification présomptive de nos souches est confirmée pour la majorité, tout au moins si l'on considère la différenciation des genres Aeromonas et Vibrio. Il sera cependant intéressant de poursuivre l'étude des souches non identifiées précédemment mais dont on a maintenant un caractère d'orientation diagnostique supplémentaire,



ainsi que des quelques souches non confirmées par ce test. Il s'agit des souches :

- Non identifiées sensibles :  
n° 4, 5, 8, 23, 25, 37, 62, 75, 113, 115, 116, 117.
- Non identifiées résistantes :  
n° 39, 41, 50, 51, 54, 80, 83, 85, 89, 91, 92, 96, 118, 119.
- "Aeromonas" sensibles :  
n° 12 (les 3 techniques) et n° 101 (2 techniques sur 3).

#### 4. Conclusion

L'étude de la sensibilité au O/129 de nos souches par 4 techniques différentes, nous a permis de mettre en évidence l'irrégularité des résultats obtenus avec les disques de papier imprégnés, ainsi que le problème de diffusion en milieu gélosé.

Le test au O/129 n'est qu'un test d'orientation diagnostique et n'a pas de valeur absolue. En effet, des souches de V. cholerae et V. parahaemolyticus ont été récemment trouvées résistantes au composé vibriostatique, avec des CMI supérieures à 150 µg/ml (Sundaram et Murthy, 1983; Arai et coll., 1985). Cette résistance serait codée par un plasmide conjugatif, d'après les travaux de Matsushita et coll. (1984). Plus précisément, les gènes responsables sont localisés sur le transposon Tn527 capable d'insertion dans le chromosome et dans divers plasmides (Golstein et coll., 1984).

L'utilisation du O/129 dans le diagnostic d'orientation des bactéries de la famille des Vibrionaceae pourrait donc être remise en question, avec l'apparition de souches de Vibrio résistantes à ce composé.

## V. HALOPHILIE ET HALOTOLERANCE

Les bactéries qui sont l'objet de cette étude ont été isolées du milieu marin. Il est donc intéressant d'observer leur comportement en présence et en absence de NaCl.

Il convient tout d'abord de rappeler les définitions des différents types d'halophilie (d'après BRISOU, 1980) :

- Bactéries non halophiles :

Certains microorganismes ont une croissance inhibée en présence de sel, ou tout du moins lorsque cette concentration est supérieure à 0,5 ou 1 %.

- Bactéries halophiles faibles :

Il s'agit de germes exigeant du sel pour leur développement donc halophiles strictes, mais dans des limites étroites situées entre 2 et 4,5 %.

- Bactéries halophiles modérées :

Elles exigent une concentration saline de 5 % minimum et se développent jusqu'à 20 %.

- Bactéries hyper-halophiles :

Rencontrées dans les salaisons, les saumures, les lacs salés, elles exigent 15 à 30 % de NaCl.

Parallèlement à ces catégories, il existe de nombreuses bactéries se comportant de façon plus nuancée, en présence de sel. En effet, les bactéries dites "euryhalines" se développent indifféremment en absence ou en présence de concentrations faibles de NaCl. On définit alors la notion d'halotolérance (valable également pour les halophiles strictes), c'est-à-dire la concentration maximale tolérée. Ce caractère de croissance est souvent mis à profit, soit dans l'emploi de milieux sélectifs, soit pour l'identification bactérienne (S. aureus, Streptococcus en bactériologie médicale).

Enfin, mentionnons l'halorésistance de certains germes, c'est-à-dire leur capacité de survivre et non de se multiplier, dans des milieux fortement salés.

La détermination de l'halophilie et de l'halotolérance est un test classique de l'étude de la famille des Vibrionaceae. De très nombreux auteurs effectuent cette recherche en milieu liquide :

- eau peptonée 1 % (Lee et coll., 1978b; Furniss et coll., 1978; West et Colwell, 1984)
- bouillon nutritif (Hickman et coll., 1982; Kelly, 1982)
- milieu minimum additionné de glycérol comme source de carbone (Bergey's Manual, 1984; Bauman (1971)), pour la recherche de l'halophilie.

Ces mêmes auteurs emploient l'eau peptonée pour l'étude de l'halotolérance.

Il faut cependant noter que West et Colwell (1984) recommandent une gélose à la gélatine avec et sans NaCl comme milieu d'étude préliminaire de l'halophilie.

## 1. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé deux techniques, l'une en milieu liquide, l'autre en milieu solide, la composition de base des milieux étant la même.

### a) Milieu liquide

L'étude a été réalisée en eau peptonée 1 %. 9 concentrations de NaCl ont été testées : 0 ; 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 8 ; 10 et 12 % . Grâce à un inoculateur multi-points (Dynatech), on ensemence chaque plaque de microtitration à partir d'une première plaque contenant 96 bouillons de 18 heures en eau peptonée salée à 1 % ( $10^9$  bact./ml) . Environ 1  $\mu$ l de culture est prélevé etensemencé : l'apport de NaCl dans le milieu est donc négligeable (0,2 g/ml).

Nous avons employé une microplaque pour chaque concentration de NaCl, et il s'est avéré nécessaire d'effectuer le rinçage en eau distillée des pointes de l'inoculateur, en plus de la stérilisation, après chaque microplaque ensemencée, pour éliminer les cristaux de NaCl déposés sur les pointes.

Après 24 heures d'incubation à 37° C, la lecture de la croissance est faite macroscopiquement.

#### b) Milieu solide

Il s'agit d'étudier la croissance de nos souches sur milieu gélosé. C'est un milieu uniquement composé de peptone et d'agar (annexe n° 2), additionné des mêmes concentrations de NaCl que précédemment. L'ensemencement est identique : chaque boîte de Pétri de format 120 x 120 mm, correspondant à une concentration de NaCl, est inoculée à partir de bouillons de 18 heures en microplaques ( $10^9$  bact./ml). Après séchage de la surface des géloses, les boîtes sont mises à incuber 24 heures à 37° C. On note alors la présence ou l'absence de culture pour chaque "spot" ou souche, pour chacune des concentrations étudiées.

## 2. Résultats

Les résultats détaillés sont réunis dans le tableau IV.A (annexe 1).

a) En ce qui concerne tout d'abord, l'halophilie, on ne remarque pas de nette différence entre technique en milieu liquide et en milieu solide (fig. 7 et 8).

La majorité des Aeromonas est non halophile à l'exception des souches n° 12 et 101 (milieux liquide et solide) et de la souche n° 110 (milieu solide). 50 % des souches non identifiées sont également non-halophiles.

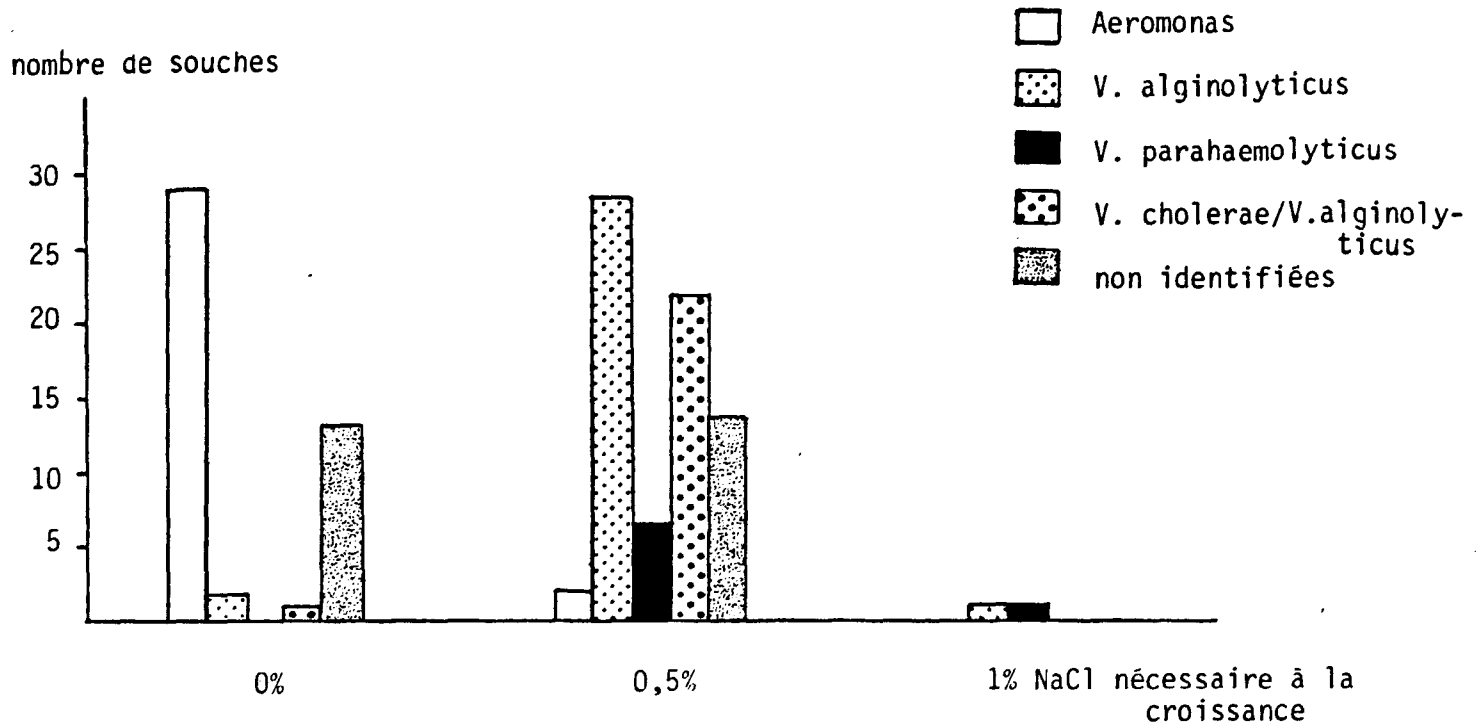


Figure 7 : Répartition des souches en fonction de leur halophilie en milieu liquide.

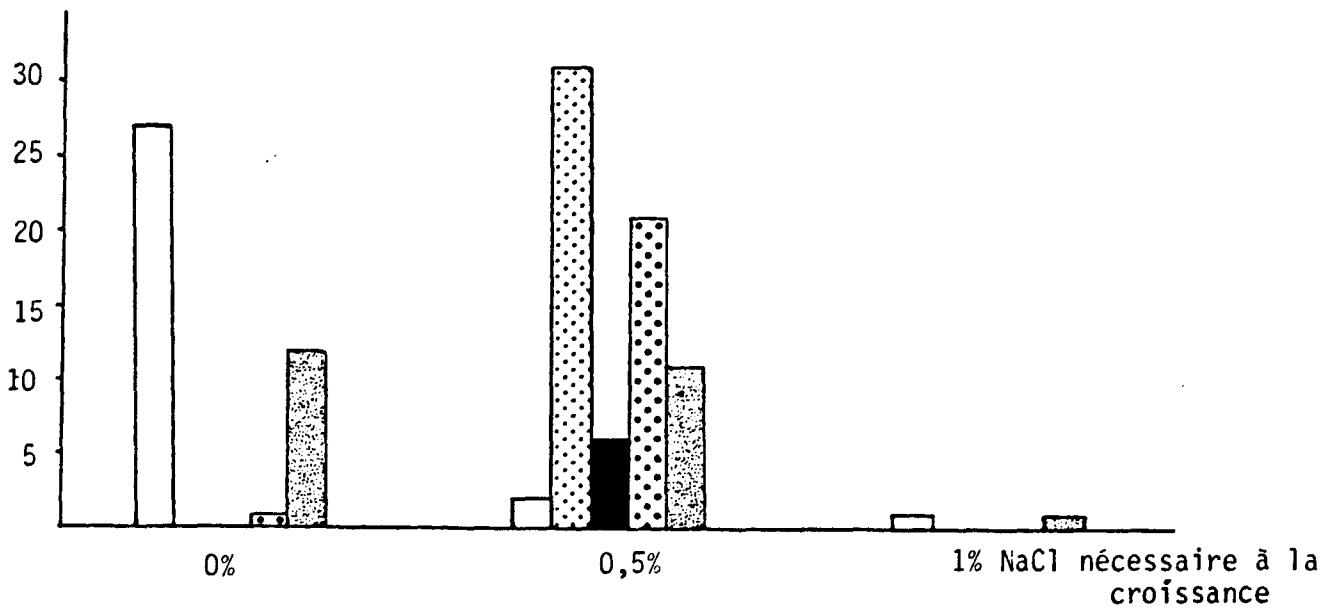


Figure 8 : Répartition des souches en fonction de leur halophilie en milieu solide.

Les Vibrio se comportent en majorité, en halophiles stricts (0,5 % NaCl nécessaire au moins pour la croissance). Font exception les souches n° 105 (discrimination insuffisante entre V. alginolyticus et V. cholerae) et n° 64, 109 et 104 (V. alginolyticus). Certaines souches sont halophiles strictes sur gélose, mais cultivent en l'absence de sel en milieu liquide (n° 64, 105, 106 et 110). Le phénomène inverse est observé pour la souche n° 109.

Quant aux souches de référence, seuls A. hydrophila et V. mimicus sont non-halophiles. Les autres Vibrio exigent 0,5 % de NaCl, sauf V. alginolyticus qui en réclame.

b) L'halotolérance des souches étudiées est reportée sur les figures 9 et 10. On remarque, quelle que soit la technique utilisée, l'halotolérance faible des Aeromonas. Aucune souche ne se développe à des concentrations en NaCl supérieures à 5 %.

Par contre, les Vibrio tolèrent des salinités nettement plus élevées :

- 8 % pour la majorité des souches en milieu solide
- 8 à 10 % en milieu liquide.

Les souches non identifiées ont une répartition homogène sur l'ensemble de la gamme des concentrations testées.

Il faut noter, d'une manière générale, que les concentrations tolérées sont plus fortes en milieu liquide, qu'en milieu gélosé. Un écart de 2 % de NaCl est enregistré en moyenne.

### 3. Discussion

Notre discussion portera essentiellement sur les résultats enregistrés en milieu liquide, qui est la technique généralement citée dans la littérature.

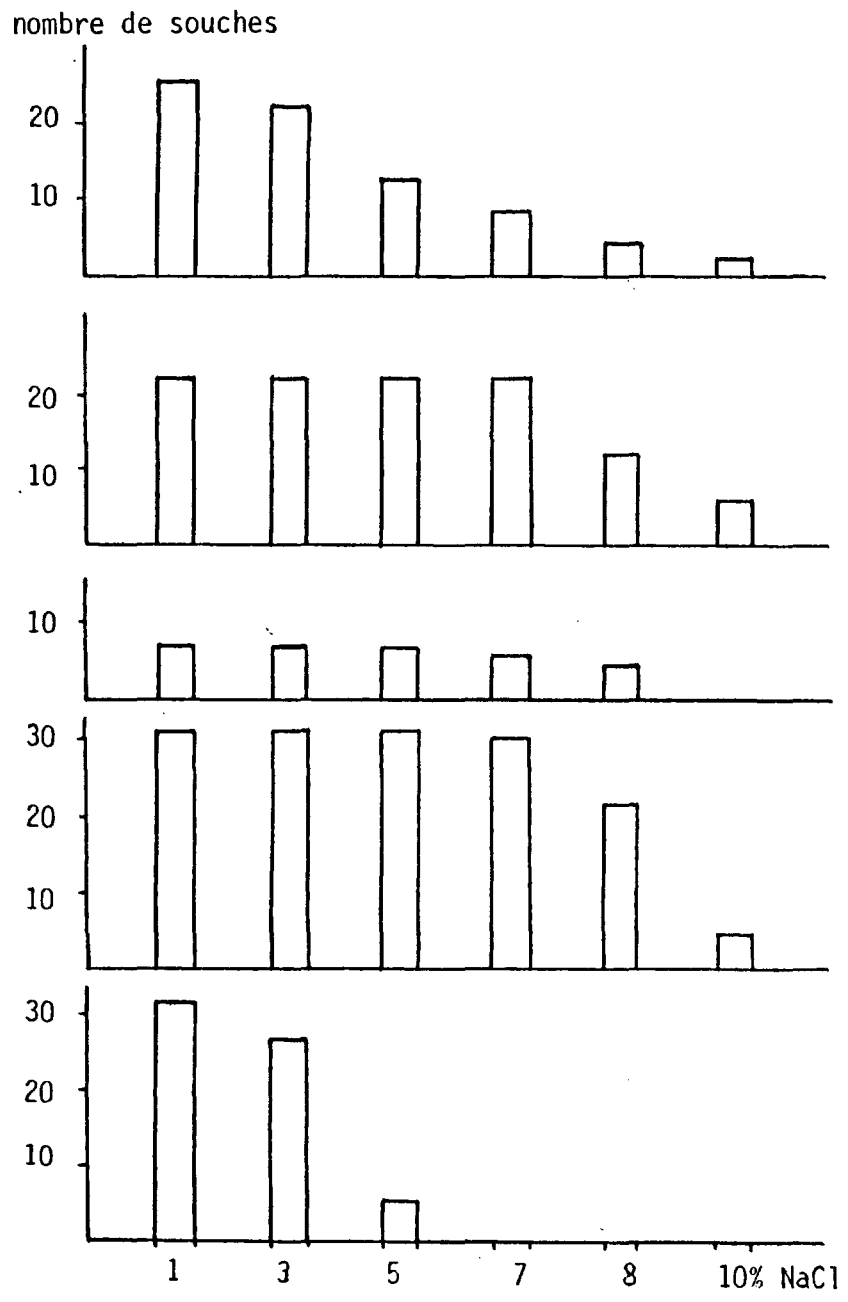


Fig. 9 : Répartition des souches en fonction des concentrations en NaCl tolérées pour la croissance en milieu liquide.

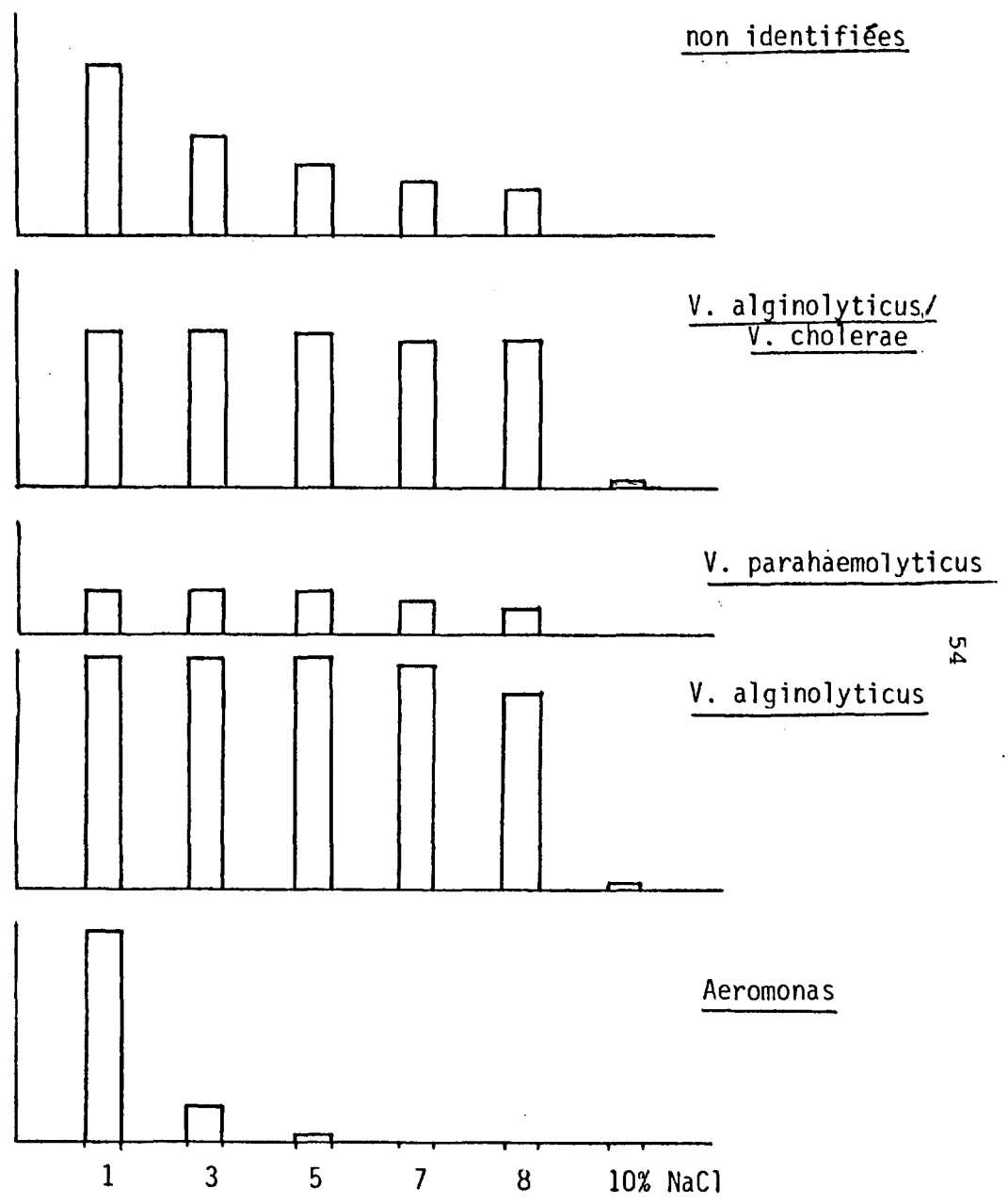


Fig. 10 : Répartition des souches en fonction des concentrations en NaCl tolérées pour la croissance en milieu solide.

Le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) sépare, au sein de la famille des Vibrionaceae, les genres Vibrio et Photobacterium, exigeant ou étant stimulés par la présence d'ions  $\text{Na}^+$  pour leur croissance, des genres Aeromonas et Plesiomonas, qui n'en réclament pas. Ce besoin en  $\text{Na}^+$  des bactéries du genre Vibrio est en fait très variable selon les espèces, puisque V. cholerae et V. metschnikovii cultivent en milieu minimum contenant moins de 0,1 mM de  $\text{Na}^+$ , tandis que V. costicola exige 200 mM de  $\text{Na}^+$ . Toutefois, la croissance des Vibrio considérés non halophiles est stimulée par la présence d'ions  $\text{Na}^+$  (Baumann et coll., 1980).

Chez les micro-organismes halotolérants,  $\text{Na}^+$  interviendrait dans le maintien de la structure membranaire (Brown, 1976), ainsi que dans l'activité enzymatique, notamment des perméases (Baumann et coll., 1971) et des systèmes de transport d'acides aminés tel que l'acide alpha-amino-isobutyrique chez V. costicola (Kushner et coll., 1983).

D'autres cations, présents dans l'eau de mer comme  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$  peuvent avoir une action synergique de  $\text{Na}^+$ .

Ainsi, Reichelt et Baumann (1974) ont montré que "Beneckea parahaemolytica", "B. alginolytica", "B. natrie gens", "B. campbellii" exigeaient 50 % de moins en NaCl quand  $\text{Mg}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$  étaient présents dans le milieu, à des concentrations de 50 mM  $\text{Mg SO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$ , par rapport au même milieu ne contenant que 2 mM  $\text{Mg SO}_4$  et 0,55 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Cependant,  $\text{Na}^+$  semble irremplaçable, comme le mentionnent Joseph et coll. (1982), dans une revue bibliographique sur V. parahaemolyticus. Le rôle de  $\text{Mg}^{++}$  a été souligné par Ma-Lin et Beuchat (1980), dans la "restauration" de V. parahaemolyticus stressés par de basses températures.



Sur un plan général, le fait d'isoler à la fois des bactéries halophiles strictes et non-halophiles d'un même écosystème marin est typique des zones littorales. En effet, il s'y produit le mélange de flores d'origine diverses, terrestres, dulcaquicoles, marines, qui se retrouvent dans un milieu intermédiaire en ce qui concerne ses caractères physico-chimiques. Si la salinité de l'eau de mer dans nos régions avoisine 35 g par litre, la teneur en NaCl des zones littorales peut-être très variable, en fonction des apports d'eaux douces terrestres (précipitations, rivières) et du flux des marées.

La faible halotolérance de certaines bactéries (Aeromonas notamment) serait donc un facteur limitant à leur survie dans ces zones. Il faut cependant tenir compte des différences rencontrées in situ et dans l'étude in vitro de cette tolérance au sel : la matière organique apportée par les rejets jouerait un rôle protecteur vis-à-vis de NaCl.

La bonne corrélation entre les souches non-halophiles et celles identifiées comme Aeromonas, confirme l'identification de ces dernières. Toutefois, les deux souches de V. alginolyticus (n° 64 et 104) se montrant non-halophiles retiendront notre attention par la suite.

Si l'on se réfère aux tables de discrimination proposées par API System, on note que l'halotolérance est utilisée pour séparer V. cholerae de V. alginolyticus : V. cholerae ne cultive pas en présence de 6,5 % de NaCl, à l'inverse de V. alginolyticus.

Toutes les souches présentant une discrimination insuffisante entre ces 2 espèces supportent au moins 7 % de NaCl en milieu liquide.

D'autre part, V. alginolyticus est considéré dans le Bergey's Manual comme une bactérie halophile stricte, ce qui est le cas de toutes ces souches d'identification API incertaine (exception = n° 105).

Nous considérons donc d'après ces critères que les 22 souches de discrimination insuffisante entre V. cholerae et V. alginolyticus sont des V. alginolyticus. La souche n° 105 serait donc un V. cholerae, ou V. mimicus, ou V. metschnikovii, puisque non halophile.

En ce qui concerne les souches non identifiées par le système API 20E, leur caractère de croissance en l'absence de sel et leur comportement vis-à-vis du composé vibriostatique sont reportés dans le tableau ci-dessous :

Souche	0 % NaCl	O/129
4	-	S
5	-	S
8	-	S
23	-	S
25	-	S
37	-	S
39	+	R
41	+	R
50	+	R
51	+	R
54	+	R
62	-	S
75	-	S
80	+	R
83	+	R
85	+	R
89	+	R
91	+	R
92	+	R
96	+	R
113	-	S
115	-	S
116	-	S
117	-	S
118	-	R
119	+	R

**Tableau VII** : halophilie et sensibilité au O/129 des souches non identifiées par API 20 E.

On note que l'ensemble des souches sensibles au 0/129 se révèlent halophiles strictes, et appartiendraient donc à des espèces halophiles du genre Vibrio. A l'inverse, les souches résistantes au 0/129 sont capables de se développer en l'absence de sel (à l'exception de la souche n° 118 qui exige 0,5 % de NaCl) et seraient donc des bactéries du genre Aeromonas.

Enfin, il semble nécessaire de réviser l'identification des souches 12 et 101 qui se révélaient précédemment sensibles au 0/129 et qui sont halophiles, alors que l'identification API 20E était A. hydrophila.

Il pourrait s'agir en fait de V. fluvialis ou de V. anguillarum I, dont nous avons vu que les profils biochimiques en API 20E étaient semblables à celui de A. hydrophila. Si l'on compare les degrés d'halotolérance, ainsi que les températures de croissance de ces souches par rapport aux souches de référence :

Souche	% NaCl max	4° C	42° C
12	5	-	+
101	5	-	+
<u>V. fluvialis</u>	7	-	+
<u>V. anguillarum I</u> :	5	+	-
- ATCC 19 264			
- CI P 408	5	+	-
- CI P 5336	5	+	-

Aucune communauté n'existe pour ces trois caractères entre ces souches 12 et 101, V. fluvialis et V. anguillarum I. Il est donc difficile de conclure à ce niveau.

Certains auteurs (Sakazaki et coll., 1968a) avaient proposé, entre autres, comme caractère de différenciation entre V. parahaemolyticus et V. alginolyticus, la possibilité de ce dernier de se développer dans un milieu contenant 10 % de NaCl. Mais il est apparu dans des études ultérieures, que ce caractère était trop variable selon les souches pour être retenu (Baumann et coll., 1973).

#### 4. Conclusion

La détermination de l'halophilie et de l'halotolérance de nos souches a permis, d'une part, d'évaluer leur comportement en absence et en présence de sel, et dans quelle proportion.

Les deux populations, halophile stricte et non-halophile sont de taille légèrement différente, puisque :

- 38,46 % des souches sont non-halophiles
- 61,54 % des souches sont halophiles strictes.

D'autre part, cette étude a apporté des éléments supplémentaires quant aux caractères phénotypiques pouvant affiner l'identification présomptive. Il est bien sûr nécessaire de compléter cet éventail de caractères et d'en assurer la synthèse.

#### Remarque :

Des études récentes ont montré le rôle joué par certains composés chimiques dans l'osmorégulation de différentes espèces de bactéries. Ainsi, l'accumulation intra-cellulaire d'ions potassium, mais aussi d'acides aminés ou de dérivés à ammonium quaternaire (bétaines), permet un ré-équilibre de la pression osmotique interne vis-à-vis d'un milieu extérieur à osmolarité élevée. Ces phénomènes ont été mis en évidence chez des Rhizobium (Le Rudulier et coll., 1983), des Entérobactéries (Korn, DEA microbiologie, Paris XI, 1985), ainsi que chez des bactéries halophiles (Kushner et coll., 1983). Le rôle de la glycine-bétaine a été tout particulièrement démontré.

Nous avons voulu vérifier si nos souches étaient concernées par ce mécanisme d'osmorégulation. L'expérience suivante a donc été menée : la croissance sur milieu minimum M 63 additionné de glucose (annexe n° 2) a été étudiée, en présence et en absence de glycine-bétaine (1 mM), à différentes concentrations de NaCl.

L'inoculum a été d'environ  $10^4$  bactéries (suspension en M63 + glucose). Après incubation de 24 heures à  $37^\circ$  C, la croissance est estimée à l'oeil nu.

Les résultats obtenus pour les 30 souches testées, essentiellement des Vibrio, sont reportés dans le tableau VIII.

En résumé,

- 23,33 % des souches n'augmentent pas leur halotolérance en présence de glycine-bétaïne,

- par contre 33,33 % l'augmentent de 2 g de NaCl pour 100 ml.

- 40 % l'augmentent de 4 g de NaCl pour 100 ml.

- 3,33 % l'augmentent de 6 g de NaCl pour 100 ml.

Il apparait donc que 75 % des souches testées sont sensibles à l'effet osmo-protecteur de la glycine-bétaïne.

Tableau VIII : Croissance de souches de Vibrio en milieu minimum en présence et en absence de glycine-bétaine, à différentes concentrations de NaCl .

n° souches	M 63				M 63 + glycine-bétaine			
	5	7	9	11	5	7	9	11
	‰ NaCl							
1	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	+	-	+	+	+	-
6	+	+	-	-	+	+	+	-
7	+	+	-	-	+	+	-	-
8	+	-	-	-	+	+	+	+
9	+	-	-	-	+	+	+	+
10	+	+	+	-	+	+	+	-
12	+	-	-	-	+	+	-	-
13	+	+	-	-	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+	+	+	-
16	+	-	-	-	+	+	+	-
17	+	-	-	-	+	+	+	-
18	+	-	-	-	+	+	+	-
20	+	-	-	-	+	+	+	-
23	+	-	-	-	+	+	-	-
26	+	+	-	-	+	+	-	-
27	+	-	-	-	+	-	-	-
28	+	+	-	-	+	+	+	-
29	+	+	-	-	+	+	+	+
30	+	+	-	-	+	+	+	-
32	+	-	-	-	+	+	+	-
33	+	-	-	-	+	+	-	-
34	+	-	-	-	+	+	+	-
35	+	+	-	-	+	+	+	-
36	+	-	-	-	+	+	+	-
37	+	+	-	-	+	+	+	-
68	+	+	-	-	+	+	+	-
69	+	+	-	-	+	+	+	-
70	+	+	-	-	+	+	-	-
71	+	+	-	-	+	+	+	+

## VI. AUXANOGRAMME

Il s'agit de l'étude de l'utilisation de différents substrats organiques comme seule source de carbone et d'énergie, en milieu synthétique. L'intérêt d'une telle recherche a été démontrée, dans le cadre des études taxonomiques des bactéries hétérotrophes, que ce soit pour les Vibrionaceae ou d'autres familles : Pseudomonadaceae (Stanier et coll., 1966), Enterobacteriaceae (Véron et Le Minor, 1975).

Le nombre de substrats étudiés est variable, mais est couramment supérieur à 10, pour atteindre parfois 150 (Baumann et coll., 1971). Les composés organiques testés appartiennent à divers groupes :

- sucres et dérivés
- acides gras et acides organiques
- acides aminés
- alcools
- composés aromatiques.

Le milieu de base utilisé est composé de sels minéraux, ainsi que d'une source d'azote. Le cas échéant, un facteur de croissance est ajouté, s'il s'agit de bactéries auxotrophes. Différents milieux ont été décrits par Baumann et coll. (1971), Clowes et Hayes, modifié par Lee et coll. (1981), Véron (1975), Stevenson (1967), pour la détermination d'auxanogrammes chez les Vibrionaceae.

### 1. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé le milieu de Clowes et Hayes, modifié par Lee et coll. (annexe 2). Deux solutions, une de  $MgCl_2$  double concentration, et une des autres sels minéraux, également double concentration, sont préparées et stérilisées sur membrane Millipore<sup>R</sup> 0,22  $\mu m$ . Ces deux solutions sont ajoutées à un même volume d'eau dans lequel 40 g d'agar ultrapur (Merck) ont été préalablement dissous et stérilisé à l'autoclave. Pour éviter une précipitation des sels, on attend que la température soit à 50° C.

Chaque substrat carboné est incorporé sous forme d'une solution aqueuse, stérilisée par filtration 0,22  $\mu\text{m}$ , et de façon à obtenir une concentration finale de 0,1 %.

Les substrats étudiés sont les suivants (Sigma) :

Acides aminés :

alanine  
aspartate  
histidine  
proline  
sérine  
glutamate

Divers :

fumarate  
 $\alpha$  kétoglutarate  
lactate  
pyruvate  
succinate  
propionate

Sucres :

arabinose  
mannose  
tréhalose  
gluconate

Une boîte de milieu minimum seul sert de témoin négatif, et une gélose additionnée de Casamino-acids sans vitamines (Difco) sert de témoin positif (Lee et coll., 1978b).

Les boîtes (120 x 120) sontensemencées à partir d'une microplaque contenant 96 bouillons de 18 heures ( $10^8$  bactéries/ml) en eau peptonée salée à 1 %, à l'aide d'un inoculateur automatique multipoints. La lecture de la croissance se fait après 48 heures d'incubation à 30° C.

Nous avons employé de l'eau bi-distillée stérile, pour éliminer toute trace de substances organiques. Une légère croissance demeurant toujours sur milieu minimum nous avons décidé d'effectuer cette étude



en milieu liquide : même milieu mais sans agar. Cette technique s'est avérée satisfaisante et a donc été retenue.

L'ensemencement se fait à partir d'une microplaque contenant les suspensions bactériennes (100 µl par puits) dans autant de microplaques que de substrats testés. Les conditions de préparation du milieu de base sont les mêmes que celles de la technique en milieu solide, ainsi que les témoins de l'incubation.

## 2. Résultats

Les résultats sont reportés dans le tableau V.A (annexe 1), à l'exception de ceux enregistrés pour le gluconate, substrat que toutes les souches utilisent, et pour le propionate, qui à l'inverse n'est assimilé par aucune souche. On notera que toutes les souches sont prototrophes, c'est-à-dire ne nécessitant pas de facteurs de croissance.

Le nombre de substrats que chaque souche est capable d'utiliser pour sa croissance varie selon le genre bactérien (fig. 11). On remarque que 91,66 % des Vibrio, toutes espèce confondue, assimilent 11 ou plus des 16 substrats carbonés testés. Les exceptions étant les souches n° 14 et 61 (9 substrats), n° 22, 36 et 60 (10 substrats).

Seuls 16,13 % des Aeromonas utilisent 10 substrats ou plus : souches n° 12, 46 et 47 (11 substrats), n° 86 (12 substrats) et n° 76 (15 substrats).

Les souches non identifiées se répartissent de façon homogène, sans qu'un nombre de substrats utilisés prédomine.

Le comportement des souches de référence est plus nuancé dans le partage Vibrio/Aeromonas, puisque les 3 souches de V. anguillarum n'assimilent que 2 à 4 composés carbonés, V. alginolyticus 9, V. mimicus 10. Seuls V. vulnificus, V. parahaemolyticus et V. fluvialis assimilent 11 substrats ou plus. Quant à A. hydrophila, sa croissance n'est possible que sur 9 des 16 substrats testés.

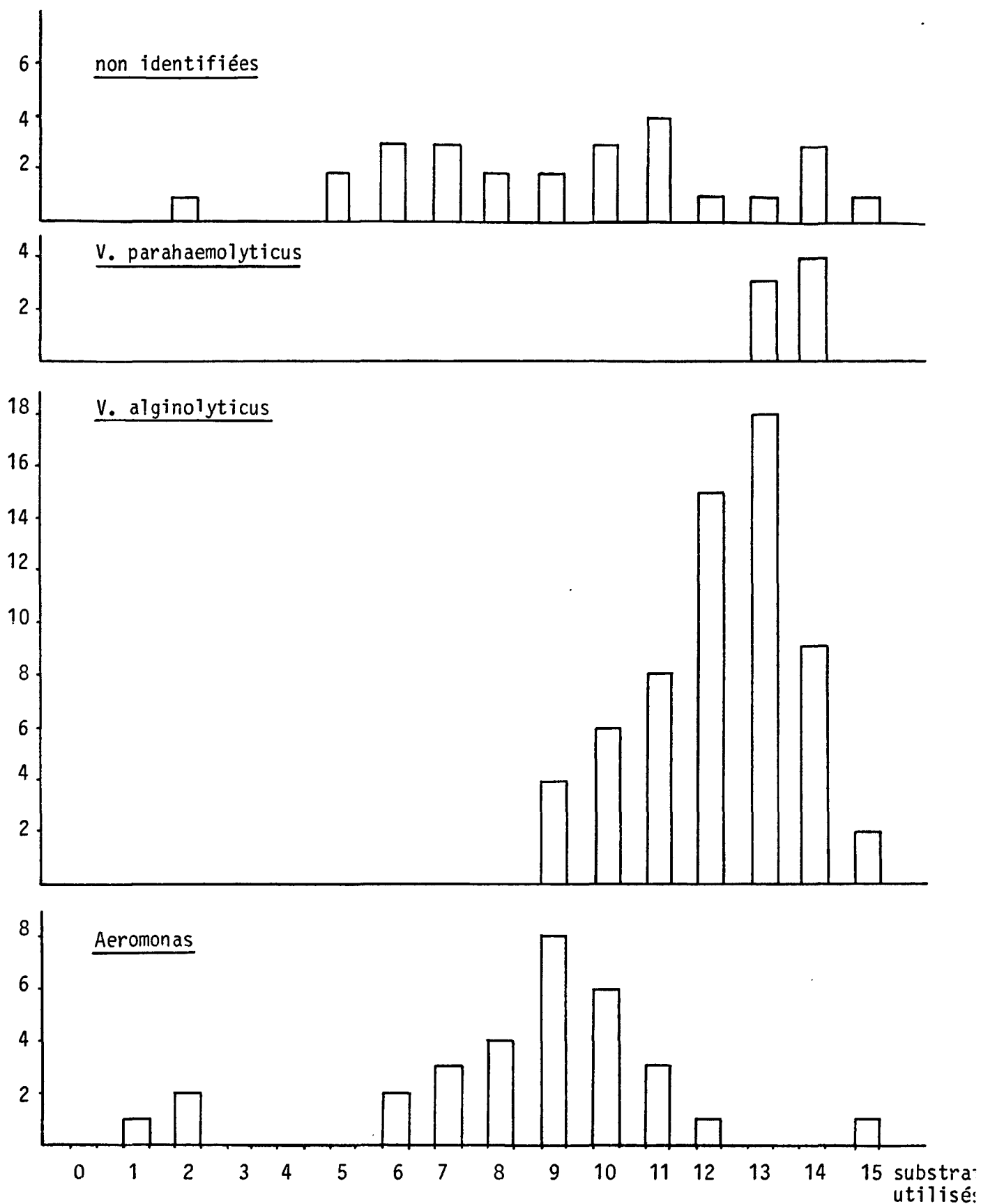


Figure 11 : nombre de substrats utilisés comme seule source de carbone et d'énergie.

A la lecture du tableau IX, on remarque que les Vibrio utilisent tous les sucres, à l'exception de l'arabinose, ainsi que les acides aminés (sauf la sérine). Parmi les autres acides, l' $\alpha$ kétoglutarate est utilisé par peu de souches, et le propionate par aucune.

En ce qui concerne les Aeromonas, la majorité des souches utilisent tous les sucres, mais les acides aminés sont, eux, peu utilisés (sauf la sérine et le glutamate). Enfin l' $\alpha$ kétoglutarate, le lactate et le propionate sont utilisés par très peu de souches.

	<u>Aeromonas</u> 31	<u>Vibrio</u> 60	Non identifiées 26
<u>Acides aminés</u>			
alanine	11	55	10
aspartate	2	53	5
histidine	6	54	13
proline	8	59	12
sérine	22	31	16
glutamate	25	60	24
<u>Sucres</u>			
arabinose	21	12	12
mannose	24	51	23
tréhalose	28	60	24
gluconate	31	60	26
<u>Divers</u>			
fumarate	26	60	23
$\alpha$ kétoglutarate	2	32	4
lactate	6	59	13
pyruvate	27	58	20
succinate	27	55	22
propionate	0	0	0

Tableau IX : Utilisation des différents types de substrats, selon le genre bactérien.

### 3. Discussion

Nous avons employé le milieu de base de Clowes et Hayes, car certains auteurs le considèrent moins sélectif que celui de Baumann et coll. (West et Collwell, 1984). L'effet inhibiteur de fortes concentrations salines sur des souches non halophiles a donc été limité.

Le choix des sources de carbone testées a été fait d'après la littérature et notamment les études de Baumann et coll. (1971), Lee et coll. (1981), Popoff et Véron (1976). Bien que d'un nombre restreint, elles mettent en évidence des comportements différents selon les groupes bactériens. Il n'est pas possible de faire une comparaison souche à souche et pour chaque substrat sans l'aide d'un traitement informatique. Les résultats de cet auxanogramme seront donc intégrés à l'étude taxonomique regroupant l'ensemble des caractères étudiés dans ce travail.

Le nombre moyen de substrats utilisés par une souche, c'est-à-dire la versatilité de souches Aeromonas et de Vibrio anguillarum a été trouvée légèrement inférieure ( $31,6 \pm 5,6$ ) à celle de V. parahaemolyticus ( $42,4 \pm 0,9$ ) par Véron et le Minor (1975), dans une étude portant sur douze souches. Ces résultats sont à rapprocher des nôtres, où l'on retrouve, toutes proportions gardées quant au nombre de substrats étudiés, un écart entre les deux genres Aeromonas et Vibrio :

Nombre moyen de substrats utilisés par une souche :

<u>Aeromonas</u> .....	8,45
<u>V. alginolyticus</u> .....	12,49
<u>V. parahaemolyticus</u> ....	13,57
non identifiées .....	9,27

On notera l'originalité de la technique employée par Véron (1975) pour cet auxanogramme. En effet, les substrats sont déposés sous forme d'une microgoutte ou de cristaux à la surface des géloses ensemencées.

Les résultats obtenus avec ces gradients de concentration seraient comparables à la méthode classique utilisant une concentration fixe de substrat incorporé, d'après Rosenthal (1974) qui utilise des disques imprégnés.

Il est impossible de décrire et de discuter dans le détail la capacité d'utilisation de substrats carbonés par toutes les espèces de Vibrionaceae. Le tableau II.C (annexe 3) d'après le Bergey's Manual regroupe les résultats d'auxanogrammes étudiés par Baumann et Baumann (1977), Jensen et coll. (1980) et Desmarchelier et Reichelt (1981), chez les Vibrio.

En ce qui concerne les bactéries du genre Aeromonas, Popoff et Véron (1976) les décrivent comme utilisant comme seule source de carbone, 19 substrats carbonés : D. ribose, D. fructose, D. galactose, D. glucose, D. maltose, D. tréhalose, D. gluconate, amidon, caprylate, pelargonate, caprate, succinate, fumarate, DL. glycérate, L. malate, glycérol, D. mannitol, L. aspartate et L. glutamate. Ces résultats recourent les nôtres, à l'exception de l'aspartate qui n'est utilisée que par 2 souches sur 31 dans notre étude.

## VII. CLASSIFICATION NUMÉRIQUE

Pour mener à bien la synthèse des résultats obtenus jusqu'ici, il était nécessaire de faire appel à une classification numérique. Il ne s'agit pas de réaliser une étude taxonomique bactérienne, aboutissant à une identification précise, mais de regrouper les souches en fonction de leur similitude et d'en discuter la répartition géographique.

### 1. Principe (d'après Véron, 1982):

La taxonomie numérique ou méthode adansonienne est basée sur le principe d'une comparaison souche à souche, par calcul d'un coefficient de similitude. Les résultats obtenus lors de l'étude d'un certain nombre de caractères sont codés numériquement, le plus souvent de façon binaire : positif 1, négatif 0, ce qui exclut les caractères quantitatifs.

On obtient ainsi une matrice de données, à partir de laquelle est calculé le coefficient de similitude pour chaque paire de souches. On utilise le plus souvent le coefficient de Jaccard-Sneath :

$$S(i, j) = \frac{Na}{Na + Nb}$$

- où
- $S(i, j)$  est le coefficient de similitude entre les souches  $i$  et  $j$ ,
  - $Na$ , le nombre de caractères positifs à la fois chez  $i$  et  $j$ ,
  - $Nb$ , le nombre de caractères différents chez  $i$  et  $j$ .

Les caractères qui n'ont pas été testés pour l'ensemble des souches ne sont pas pris en compte.

Si l'on veut prendre en considération les paires de caractères négatifs, on emploiera le coefficient "simple matching" (d'après Colwell et Austin, 1981) :

$$S_{SM} = \frac{Na + Nc}{Na + Nb + Nc}$$

où  $Nc$  est le nombre de caractères négatifs chez  $i$  et  $j$ .

Le coefficient de Jaccard-Sneath peut être remplacé par l'indice de distance :

$$D(i, j) = 1 - S(i, j) = \frac{Nb}{Na + Nb}$$

On réalise ensuite l'analyse de ces données, de façon à regrouper les souches les plus semblables en classes de similitude, en commençant par celles présentant une distance minimale, puis peu à peu, en incorporant groupes et souches ayant une distance plus grande. Il s'agit de la méthode hiérarchique ascendante, ou d'analyse de grappes.

Les méthodes d'aggrégation d'une grappe  $i$  avec une quelconque grappe  $(j \cup k)$  les plus employées en taxonomie bactérienne sont les suivantes :

- 1) méthode du diamètre minimal :

$$D(i, jk) = \text{minimum} [D(i, j), D(i, k)]$$

- 2) méthode du diamètre maximal :

$$D(i, jk) = \text{maximum} [D(i, j), D(i, k)]$$

- 3) méthode du diamètre moyen :

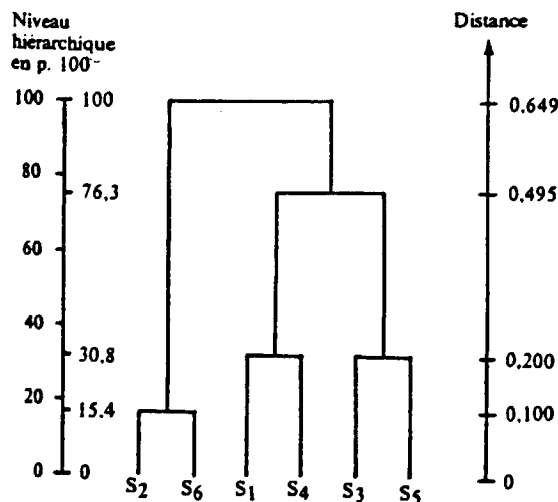
$$D(i, jk) = \frac{[M_j \times D(i, j) + M_k \times D(i, k)]}{[M_j + M_k]}$$

où  $M$  est l'effectif de chaque grappe.

- 4) méthode de la variance :

où l'on fait intervenir un facteur de pondération sur la distance  $D(i, jk)$ , ce qui minimise la variance intra-grappe.

La représentation graphique d'une telle classification est un dendogramme (d'après Véron, 1982) :



On délimite ensuite les différentes classes en choisissant comme niveau de coupure du dendrogramme, un ou plusieurs niveaux hiérarchiques.

## 2. Matériel et méthodes :

### - Caractères retenus :

Les 43 caractères retenus pour cette classification figurent dans le tableau suivant :

- 1 - O.N.P.G.
- 2 - hydrolyse de l'arginine
- 3 - décarboxylation de la lysine
- 4 - décarboxylation de l'ornithine
- 5 - utilisation du citrate de sodium
- 6 - présence d'une uréase
- 7 - production d'indole
- 8 - réaction de Voges-Proskauer
- 9 - liquéfaction de la gélatine
- 10 - fermentation de l'inositol
- 11 - fermentation du sorbitol
- 12 - fermentation du rhamnose
- 13 - fermentation du saccharose
- 14 - fermentation du mélibiose
- 15 - fermentation de l'amygdaline
- 16 - fermentation de l'arabinose
- 17 - réduction des nitrates en nitrites
- 18 - réduction des nitrates jusqu'au stade azote
- 19 - croissance en l'absence de NaCl (eau peptonée)
- 20 - croissance en présence de 0,5 % NaCl (eau peptonée)
- 21 - croissance en présence de 1 % NaCl (eau peptonée)
- 22 - croissance en présence de 3 % NaCl (eau peptonée)
- 23 - croissance en présence de 5 % NaCl (eau peptonée)
- 24 - croissance en présence de 7 % NaCl (eau peptonée)
- 25 - croissance en présence de 8 % NaCl (eau peptonée)



- 26 - croissance en présence de 10 % NaCl (eau peptonée)
- 27 - croissance à 4° C (eau peptonée)
- 28 - croissance à 42° C (eau peptonée)
- 29 - sensibilité au composé vibriostatique O/129
- 30 - utilisation de l'alanine
- 31 - " " L. (+) arabinose
- 32 - " " L. aspartate
- 33 - " " fumarate
- 34 - " " L. glutamate
- 35 - " " L. histidine
- 36 - " "  $\alpha$  kéto-glutarate
- 37 - " " lactate
- 38 - " " D (+) mannose
- 39 - " " proline
- 40 - " " pyruvate
- 41 - " " sérine
- 42 - " " succinate
- 43 - " " D (+) tréhalose.

Les caractères 1 à 18 représentent les caractères biochimiques étudiés sur galerie API 20E. Ne sont pas pris en compte les caractères non discriminants, c'est-à-dire négatifs ou positifs pour toutes les souches. Nous avons donc éliminé les caractères suivants :

- production d'H<sub>2</sub>S,
- présence d'une tryptophane-désaminase (TDA),
- fermentation du glucose,
- " " " mannitol.

En ce qui concerne les caractères de culture avec ou sans NaCl, ce sont les résultats obtenus par la technique en milieu liquide qui ont été retenus. Les croissances à 4 et 42 ° C ont seules été prises en compte.

Pour la sensibilité au composé vibriostatique O/129, ce sont les résultats de la méthode des comprimés ROSCO qui sont repris, le diamètre critique étant fixé à 15 mm : > : sensible  
< : résistant

Enfin, ne figurent pas dans l'auxanogramme l'utilisation du propionate et du gluconate, respectivement négative et positive pour toutes les souches étudiées.

#### - Codification des caractères

Chaque caractère est codé de la façon suivante :

- résultat positif : 1
- résultat négatif : 0

La résistance au O/129 est codée 0, la sensibilité 1.

#### - Programme :

Les souches sont comparées deux à deux par le calcul d'un coefficient de similitude tenant compte des caractères négatifs et positifs, puis regroupées en phénons selon la méthode de la variance (programme fourni par D. PRIEUR, UBO, Brest).

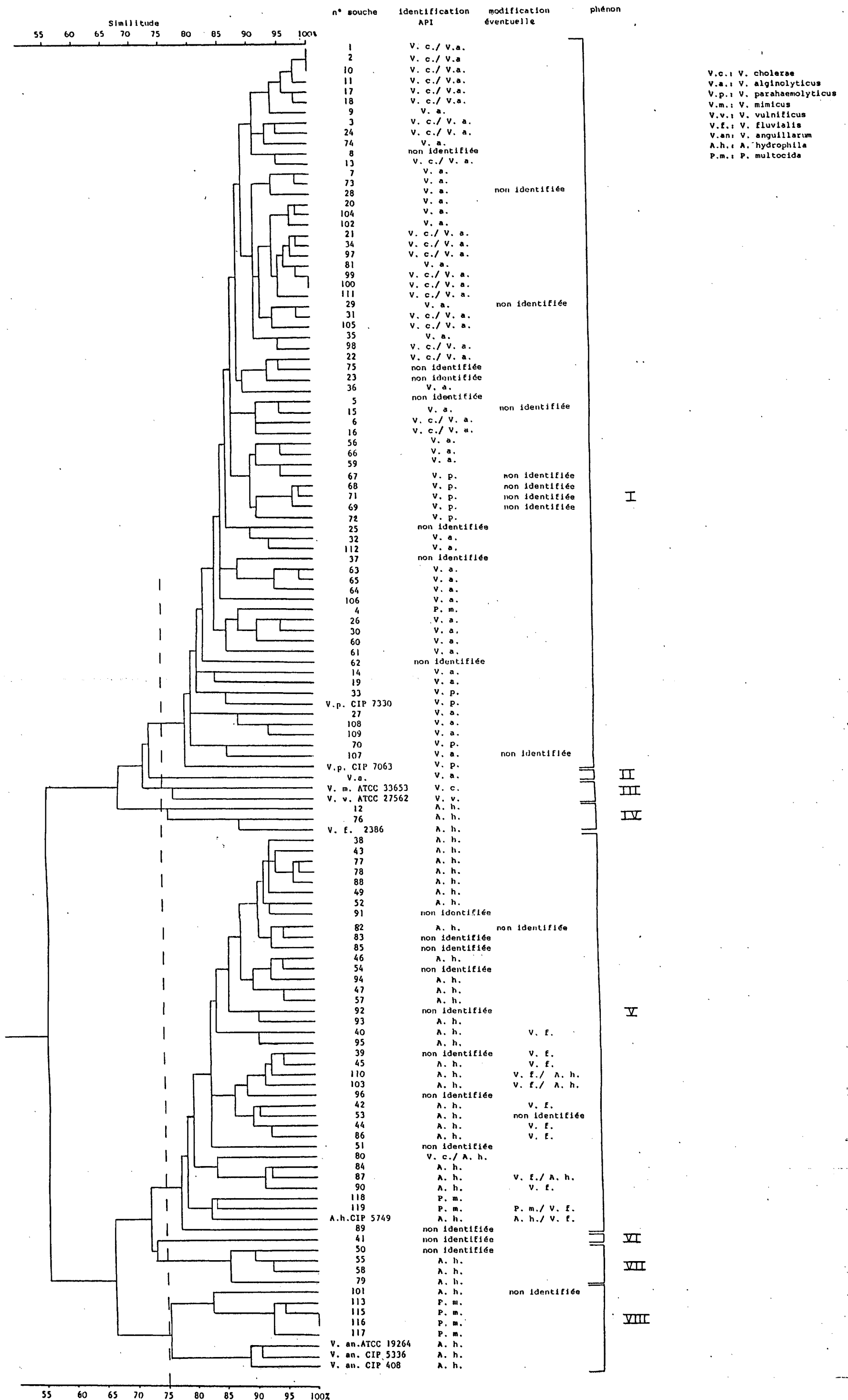
Les calculs ont été effectués sur ordinateur par M. BRETON (IFREMER, Brest).

### 3. Résultats et discussion

Le dendogramme de classification est présenté sur la figure 11. Il est nécessaire, pour la description des groupes obtenus, de "couper" le dendogramme à un ou plusieurs niveaux de similitude.

Le choix de ce niveau de coupure est très souvent subjectif (Colwell et Austin, 1981), bien que Véron (1974) ait proposé une méthode de calcul d'un coefficient d'acuité pour la détermination du niveau optimal de coupure.

Figure 11 : Dendogramme obtenu après classification numérique.



Le nombre de phénons différenciés au niveau de similitude choisi (75 %) est de 8.

- Le phénon I regroupe 70 souches, dont les 2 souches de V. parahaemolyticus de référence CIP 7330 et CIP 7063. Il s'agit essentiellement de souches de Vibrio : V. alginolyticus, discrimination insuffisante entre V. cholerae et V. alginolyticus, et V. parahaemolyticus (identification API 20 E). Font également partie de ce groupe, 7 souches non identifiées API 20 E : n° 8, 75, 23, 5, 25, 37 et 62, ainsi que la souche n° 4 identifiée comme P. multocida.

On ne distingue pas de sous-phénon différenciant les V. alginolyticus des souches de discrimination insuffisante entre V. cholerae et V. alginolyticus : notre hypothèse est donc confirmée selon laquelle ces souches halophiles strictes seraient des V. alginolyticus.

Il est intéressant de noter que les 7 souches non identifiées dans ce phénon s'étaient révélées sensibles au 0/129, halophiles strictes, et utilisaient de 11 à 15 substrats sur 16 testés : leur appartenance au genre Vibrio est donc confirmée. La souche n° 105, pourtant non halophile se place parmi des souches halophiles, avec un coefficient de similitude élevé (94 %). Il en est de même des souches 64 et 104 dont l'identification présomptive était V. alginolyticus.

- le phénon II n'est constitué que d'une seule souche : souche de V. alginolyticus provenant du département de microbiologie du Dr. R.R. Colwell, mais qui n'est pas à proprement parler, une souche de référence.

- Le phénon III regroupe 2 souches de référence : V. mimicus ATCC 33653 et V. vulnificus ATCC 27.562. Ces 2 souches n'ont logiquement, qu'un coefficient de similitude de 77 %.

- Le phénon IV est également un petit phénon, ne regroupant que 3 souches, dont la souche de référence V. fluvialis biotype I, 2386. Les deux autres souches sont des A. hydrophila, selon l'identification API. Or la souche n° 12 avait retenu notre attention, du fait de son halophilie, de sa sensibilité au composé vibriostatique, et du nombre élevé (11) de substrats utilisés comme seule source de carbone et d'énergie. Il semble donc qu'il s'agisse d'un V. fluvialis.

Le cas de la souche n° 76 est un peu différent, car bien que non-halophile et résistante au 0/129, elle présente un degré de similitude élevé (88 %) avec la souche de référence V. fluvialis.

- Le phénon V regroupe l'ensemble des A. hydrophila : 26 souches, ainsi que 9 souches non identifiées, P. multocida (n° 118 et 119) et 1 discrimination insuffisante entre V. cholerae et A. hydrophila (n° 80). La souche de référence A. hydrophila CIP 5749 est également membre de ce phénon.

Les 9 souches non identifiées (n° 91, 83, 85, 54, 92, 39, 96, 51 et 89) sont non-halophiles, résistantes au 0/129 et utilisent moins de 11 substrats sur 16 testés, comme seule source de carbone. Il est donc confirmé que ces souches appartiennent au genre Aeromonas.

La souche n° 80 (qui était résistante au composé vibriostatique) est également assimilée à A. hydrophila. Enfin, 2 souches identifiées comme P. multocida sont proches de la souche de référence. Nous les considérons comme A. hydrophila, malgré l'halophilie de la souche n° 118.

- Les phénons VI et VII sont composés, respectivement, de 1 souche non identifiée (n° 41) et de 4 souches (3 A. hydrophila et 1 souche non identifiée).

Ces 2 phénons sont reliés à un niveau légèrement inférieur au niveau de coupure du dendrogramme (74 %), avec le phénon précédent (Aeromonas). Il s'agirait donc d'une autre espèce d'Aeromonas.

- Le phénon VIII regroupe 8 souches, dont les 3 souches de référence de V. anguillarum (ATCC 19264, CIP 408 et CIP 5336), 4 souches P. multocida et 1 A. hydrophila. Les 3 souches de V. anguillarum forment un sous-phénon net ayant peu de similitude avec les autres souches. Celles-ci sont halophiles, inhibées par le composé vibriostatique mais n'utilisent que 5 à 7 substrats carbonés. Nous avons vu que l'identification P. multocida ne pouvait être acceptée, compte-tenu de la mobilité de ces souches. En l'occurrence, nous les considérerons comme non identifiées car nous ne pouvons pas, dans les limites de cette étude, les assimiler à une espèce bactérienne.

Nous tiendrons compte, à ce niveau de la discussion, des modifications observées dans les identifications avec la dernière édition du catalogue analytique API. Ces identifications sont reportées sur le dendogramme. On remarque que 4 des 5 souches du groupe de V. parahaemolyticus isolé par rapport aux souches de référence, deviennent non identifiées. 4 souches de V. alginolyticus sont dans le même cas, tout en étant dispersées. V. mimicus ATCC 33 653 et V. fluvialis 2386 sont, cette fois, correctement identifiés. De même, la souche n° 76 se voit confirmée par l'identification V. fluvialis. C'est dans le phénon V, regroupant les Aeromonas, que le plus grand nombre de souches ont leur identification modifiée. Ainsi, 12 souches (dont A. hydrophila CIP 5749) deviennent soit V. fluvialis, soit la discrimination est insuffisante entre A. hydrophila et V. fluvialis. L'ambiguïté de la détermination API en ce qui concerne A. hydrophila et V. fluvialis apparaît ici nettement.

On notera également, que V. anguillarum n'est pas identifié comme tel, quelle que soit l'édition du catalogue analytique.

En résumé, les souches étudiées se répartissent, grâce à cette classification numérique, en 3 grands groupes :

- groupe des Vibrio
- " " A. hydrophila
- " de souches non identifiées et V. anguillarum.

Le but de cette classification numérique n'était pas de réaliser une taxonomie détaillée des souches étudiées (nous aurions choisi un nombre plus grand de caractères et de souches de référence) mais bien de vérifier la validité de l'identification donnée par le système API 20E. Et d'autre part, d'évaluer l'hétérogénéité de la flore isolée.

En ce qui concerne le premier point, il se présente 2 éventualités :

- 1) l'identification API est confirmée pour :
  - 100 % des Vibrio,
  - 80,65 % des Aeromonas.
  
- 2) les souches non identifiées API se répartissent parmi :
  - les Vibrio : 8 souches
  - les Aeromonas : 12 "
  - inclassables : 6 " dont 2 assez proches des Aeromonas et 4 plus différenciées.

Remarque : les souches P. multocida sont considérées non identifiées, ainsi que la souche de discrimination insuffisante entre V. cholerae et A. hydrophila.

L'identification API 20E des bactéries du genre Vibrio semble donc satisfaisante, tout au moins jusqu'au stade du genre.

Par contre, près de 20 % des souches identifiées comme A. hydrophila ne sont pas confirmées par la classification numérique.

La recherche de l'halophilie et de la sensibilité au composé vibriostatique comme caractères complémentaires des gammes API 20E est recommandée par certains auteurs (Maugeri et coll., 1983; Seidler et coll., 1980). Ces 2 caractères nous apparaissent en effet indispensables pour séparer V. alginolyticus et V. cholerae, V. fluvialis et A. hydrophila, ainsi que pour infirmer une identification (V. anguillarum).

La recherche de la mobilité est également essentielle.

Le deuxième objectif de la classification numérique entreprise était l'étude de la diversité des souches isolées dans chaque zone d'étude. La connaissance de la diversité des biotypes rencontrés permet d'évaluer le risque sanitaire lié à la prolifération d'un biotype.

Pour cela, nous avons comparé à chaque niveau de similitude, le nombre de souches non regroupées. Plus le nombre de souches isolées est grand aux niveaux bas de similitude, plus la flore sera hétérogène. On obtient donc, pour chaque zone géographique d'origine, les résultats suivants :

Niveau de similitude	% souches non regroupées	
	Brest	St Brieuc
100	93,42	94,3
99	"	"
98	77,6	85,7
97	"	82,86
96	"	77,14
95	56,58	74,29
94	38,16	71,43
93	28,95	57,14
92	27,63	45,71
91	22,37	28,57
90	18,42	22,86
89	"	20
88	13,14	17,14

On remarque que les souches isolées de la rade de Brest se regroupent très vite, puisque au niveau de 95 % de similitude, seulement 56,6 % des souches restent non agrégées, et au niveau de 90 % de similitude, 18,4 %.

Par contre, pour la baie de St Brieuc, le pourcentage de souches non regroupées à 95 % de similitude est de 74,3 et à 90 %, de 22,9.



Quant aux souches provenant de moules de l'estuaire de la Vilaine, elles se regroupent, pour 3 d'entre elles à 97 % de similitude, les 3 autres n'étant associées qu'à des niveaux inférieurs à 90 %.

La flore des Vibrionaceae isolées en rade de Brest apparaît donc relativement homogène. Sans aucun doute, faut-il garder à l'esprit les dimensions de cette classification numérique : 43 caractères ont été utilisés, et l'on peut discuter leur valeur discriminante. Cependant, par cette même classification, on observe une flore beaucoup plus hétérogène, en baie de St Brieuc, plus largement ouverte sur la mer, et dont les eaux sont sans doute plus fréquemment renouvelées que celles de la rade de Brest.

#### VIII. OBSERVATION D'UN CARACTERE INSTABLE

Lors de cette étude, nous avons observé l'instabilité chez nos souches de V. parahaemolyticus, du caractère de fermentation du saccharose. Ce phénomène n'ayant pas été décrit, à notre connaissance, dans la littérature, il nous a semblé intéressant de rechercher l'explication de cette variation biochimique. Certains auteurs mentionnent toutefois des souches de V. parahaemolyticus fermentant le saccharose : Fujino et coll. (1974) en dénombrent 2 sur 200 souches d'origine marine et humaine, Colwell (1970) également 2 sur 35 souches étudiées, et Ayres et Barrow (1978), 6,9 %. Il s'agit dans ces cas, de souches trouvées d'emblée fermentant le saccharose et non pas d'une variation de ce caractère.

En effet, à l'isolement, nos souches s'étaient montrées saccharose (S) - sur milieu TCBS et en API 20E. Après plusieurs sub-cultures, un isolement sur milieu TCBS a révélé un mélange de colonies saccharose + (jaunes) et saccharose - (vertes). Après vérification en milieu andrade-peptone additionné de saccharose, toutes nos souches de V. parahaemolyticus présentent cette variation. Il s'agit des 7 souches incluses dans l'étude phénotypique précédente, et de 4 souches non prises en compte.

A noter également, une souche (n° 31), à l'origine S +, montrant le même phénomène. La variation s'effectue majoritairement dans le sens - → +.

La comparaison des caractères biochimiques API 20E, de l'auxanogramme et de la résistance aux antibiotiques des variants saccharose + avec les souches d'origine, ne fait pas apparaître d'autre caractère covariant.

Différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer cette instabilité du caractère saccharose :

- la conversion lysogénique des souches S - : le prophage intégré au DNA chromosomique bactérien muterait le gène saccharose. La perte du prophage permettrait alors l'expression du gène.
- présence de plasmides : un transposon est intégré dans le DNA bactérien, au niveau du gène saccharose, et sa transposition sur un plasmide permettrait la lecture du gène. Il y aurait donc, chez les souches S +, un, ou des plasmides de taille supérieure à ceux des souches S -.

Ces 2 éventualités ont donc été étudiées :

#### 1) Recherche de bactériophages :

On peut envisager plusieurs rôles joués par un bactériophage tempéré :

- V. parahaemolyticus S - ayant un prophage intégré dans le DNA chromosomique et masquant le gène saccharose. La perte spontanée de ce prophage permet l'expression du gène : la bactérie devient S + .
- V. parahaemolyticus S - devient lysogène pour un prophage porteur du gène saccharose.

Pour la mise en évidence de bactériophages, nous avons induit nos souches S - aux U.V., puis à la mitomycine C.

a) induction aux U.V. :

Une suspension de chacune des 7 souches S - est réalisée dans 10 ml d'eau peptonée salée à 1 %. Chaque suspension ( $10^7$  bact./ml) est exposée aux U.V. dans une boîte de Pétri sans couvercle, pendant différents temps : 30 s., 1,3 et 4 minutes. La suspension est incubée 6 heures à 37° C puis filtrée sur Millipore<sup>R</sup> de porosité 0,45 µm, de façon à recueillir dans le filtrat, les phages libérés. On dépose une goutte de ce filtrat à la surface d'une gélose trypticase-soja préalablement ensemencée en nappe par la souche de départ, et séchée. Après 18 heures d'incubation à 37° C, l'observation d'une lyse de la culture bactérienne au niveau du "spot" indique la présence de bactériophages.

Pour aucune des souches testées nous n'avons obtenu de plage de lyse, quel qu'ait été le temps d'exposition aux U.V.

b) induction à la mitomycine C :

L'induction à la mitomycine C (SIGMA) a été effectuée sur cultures en phase exponentielle de croissance. 50 µl d'une solution à 0,1 mg/ml de mitomycine C sont ajoutés à 5 ml d'une culture de 3 heures en bouillon trypticase-soja. Après 18 heures d'incubation à 37° C, le bouillon est filtré sur Millipore 0,45 µm et une goutte du filtrat est déposée à la surface d'une gélose trypticase-soja ensemencée par la souche de départ. De même que par la précédente technique, nous n'avons pas observé de lyse bactérienne.

Il ne semble donc pas qu'un bactériophage soit à l'origine de l'expression du gène saccharose chez nos souches de V. parahaemolyticus. Peu de cas de V. parahaemolyticus lysogènes ont été signalés dans la littérature : Nakanishi et coll. (1966) ont isolé spontanément un phage à partir d'une souche lysogène. De même Taniguchi et coll. (1984) rapportent le cas de 2 souches à partir desquelles ils ont isolé un phage sans induction particulière. Mais aucun de ces phages n'a été trouvé être à l'origine d'une variation phénotypique.

## 2) Recherche de plasmides :

Dans un deuxième temps, nous avons voulu savoir si le caractère saccharose était transférable. Pour cela, nous avons réalisé :

- une conjugaison entre souches S + et S -
- une extraction de plasmides.

### a) conjugaison

Nous avons réalisé une conjugaison visant à mettre en évidence un transfert entre souches S - et souches +. Des mutants résistants à la streptomycine chez 6 souches S + ont été sélectionnés sur un gradient de Zybalski (Manual of methods for general microbiology, ASM, 1981). La résistance à la streptomycine est employée comme marqueur chromosomique de la souche réceptrice. La CMI des mutants est déterminée sur gélose trypticase-soja additionnée de streptomycine : elle est pour la totalité des souches supérieure ou égale à 1000 µg/ml. Chaque mutant S + résistant est mis en culture, en bouillon trypticase-soja, avec la souche S - sensible (CMI 12,5 µg/ml) correspondante. Après incubation de 18 heures à 37° C, les bouillons sont repiqués sur milieu TCBS contenant de la streptomycine à la concentration de 1000 µg/ml. On recherche alors la présence de colonies S - représentant les bactéries réceptrices.

Aucune des 6 conjugaisons effectuées n'a permis d'isoler de telles colonies. Il apparaît donc que le caractère saccharose n'est pas transférable par conjugaison (plasmide conjugatif).

### b) extraction de plasmides :

Nous avons recherché d'éventuels plasmides, à la fois chez les souches S - et les souches S +, soit un total de 16 souches.

La technique d'extraction utilisée est celle de Hansen et Olsen (1978), avec action du lysozyme et SDS (Sodium dodecyl sulfate), dénaturation alcaline de l'ADN chromosomique, précipitation des protéines par le mélange SDS-NaCl, et enfin précipitation de l'ADN plasmidique par le PEG. L'extraction a été faite à partir d'une

culture en BHI (annexe 2) de 20 ml. Les extraits sont ensuite soumis à une électrophorèse horizontale en gel d'agarose (0,7 %) et tampon tris-borate (TBE).

On répartit dans chaque puits, 20 µl d'extrait, 10 µl de RNase, et 10 µl de colorant (bleu de bromophénol 0,01 g ; saccharose 1 g ; SDS 0,2 g pour 10 ml d'eau).

Après migration de 2 heures à 120 Volts, le gel est coloré au bromure d'éthidium (solution à 0,5 µg/ml) pendant 15 minutes à l'obscurité. Après rinçage à l'eau distillée, on observe le gel en lumière ultra-violette.

Une souche de V. parahaemolyticus, porteuse du plasmide R 16 (a) : TN 1527 (fournie par M. COURVALIN, Institut Pasteur, PARIS) a été utilisée comme témoin positif. La taille de ce plasmide est d'environ 100 kilobases.

Aucune des souches étudiées ne présente de plasmides. L'hypothèse d'un transposon intégré au chromosome et masquant le gène saccharose n'est pas écartée, mais apparemment, ce transposon ne se transpose pas sur un plasmide.

Les différentes études relatives à la recherche de plasmides, chez V. parahaemolyticus n'ont pas mis en évidence de corrélation entre la présence de plasmides et des caractères biologiques (Guerry et Colwell, 1977 ; Arai et coll., 1983).

Des expériences d'insertion d'un transposon connu dans le chromosome de souches de Vibrio ont été menées, créant des "mutations" (Thomson et coll., 1981; Belas et coll. 1984).

3) En conclusion, l'instabilité du caractère saccharose de nos souches ne semble pas lié à la présence de prophages (conversion lysogénique), ni à celle de plasmides. L'hypothèse la plus séduisante est celle d'un transposon ayant un effet "mutagène" par intégration au

niveau du gène saccharose, ou par perturbation de la lecture de ce gène. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour apporter l'explication de ce phénomène.

L'importance du caractère saccharose pour la différenciation V. parahaemolyticus/V. alginolyticus est largement reconnue dans la littérature, bien que des exceptions aient été relevées.

Il est intéressant de noter que nos souches identifiées V. parahaemolyticus, ainsi que les souches de référence, ne se placent pas dans un phénon distinct des V. alginolyticus, lors de la classification numérique. L'instabilité du caractère saccharose conforte cet état de fait.

**ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE HUMAIN**

## I. INTRODUCTION

### A - Vibrionaceae rencontrées en pathologie humaine

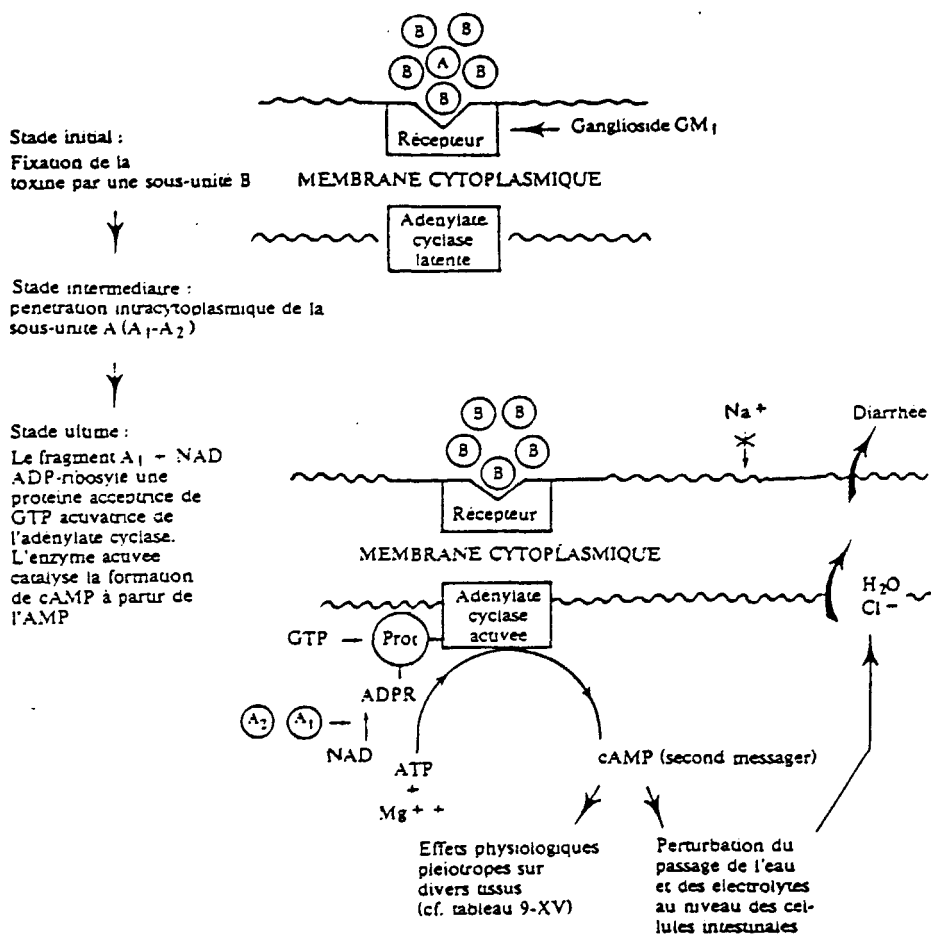
Les bactéries de la famille des Vibrionaceae occupent depuis plusieurs années, une place grandissante dans le domaine du pouvoir pathogène humain. A côté de V. cholerae, agent du choléra, et connu depuis la fin du XIXe siècle, de nombreuses espèces ont été reconnues récemment responsables d'infections chez l'homme.

Nous en ferons une revue rapide :

#### 1) V. cholerae :

La septième pandémie de choléra a débuté en 1961 en Indonésie et se poursuit encore actuellement, touchant l'Asie du Sud-Est, l'Afrique et l'Europe orientale. Responsable de cette pandémie, V. cholerae biovar eltor, est un biotype de V. cholerae (OMS, 1981). La pathogénicité de V. cholerae est liée à la production d'une exotoxine protéique, thermolabile, ainsi qu'à son pouvoir d'adhésion aux entérocytes. La toxine cholérique a été très étudiée et on en connaît maintenant la structure et le mode d'action (Gammel, 1984). Elle est formée de sous-unités ayant chacune un rôle particulier : les sous-unités B se fixent sur des récepteurs membranaires (gangliosides GM1) permettant le détachement des sous-unités A et leur pénétration dans la cellule. Il y a alors activation de l'adényl-cyclase, entraînant la formation d'AMP-cyclique à partir de l'ATP (fig 12). Il s'ensuit une inhibition de l'absorption active d'ions Na<sup>+</sup> par la cellule et par contre une stimulation de la sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> et d'eau dans la lumière intestinale, d'où une diarrhée profuse pouvant entraîner la mort par déshydratation. Plusieurs hypothèses expliquant le phénomène de colonisation de la muqueuse intestinale par V. cholerae ont été avancées : production de mucinase, d'hémagglutinines, présence d'antigènes flagellaires, chimio-tactisme, et récemment, action de la toxine cholérique elle-même (Pierce et coll., 1985).





**Fig. 12 :** Mécanisme d'action de la toxine cholérique (d'après Alouf, 1982).

Les bactéries restent strictement localisées à l'intestin, et il n'y a pas franchissement de la barrière cellulaire.

La contamination se fait essentiellement par voie orale, par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments souillés.

La survie de V. cholerae dans l'environnement a été récemment montrée, notamment aux U.S.A. dans des zones indemnes de pollution fécale (Colwell et coll., 1981). Huq et coll. (1983) ont observé une association étroite avec des éléments du zooplancton (Copépodes) apportant ainsi des éléments nouveaux dans la connaissance de l'écologie de V. cholerae.

2) V. cholerae - non O<sub>1</sub> :

Longtemps, V. cholerae sérotype O<sub>1</sub> a été considéré comme seul pathogène, à l'exclusion de Vibrio très proches sur le plan biochimique, mais n'agglutinant pas en sérum anti-O<sub>1</sub> (Vibrio "NAG" : non -agglutinables, ou "VNC" : Vibrio non-cholerae). Depuis peu, la responsabilité de ce groupe de Vibrio a été mise en évidence dans des épisodes diarrhéiques (OMS, 1981) ainsi que dans des infections extra-intestinales (Hughes et coll., 1978b). La pathogénicité de ces bactéries serait liée à la production d'une entérotoxine identique au point de vue immunologique et biologique à la toxine cholérique (Craig et coll., 1981), tout au moins pour certaines souches. Certaines diarrhées à V. cholerae non O<sub>1</sub> sont sanglantes et seraient dues, d'après Honda et coll. (1985a) à une hémolysine semblable à celle de V. parahaemolyticus. Une toxine thermo-stable (ST) a également été mise en évidence par ces mêmes auteurs. Enfin, certaines souches seraient invasives (Robins-Browne et coll., 1977).

3) V. mimicus :

Cette espèce, décrite en 1981 (Davis et coll) est proche de V. cholerae sur le plan phénotypique. V. mimicus a été isolé aussi bien d'eau et de coquillages que de selles diarrhéiques. C'est pourquoi plusieurs auteurs ont étudié le pouvoir pathogène de V. mimicus : Davis et coll. (1981) ont mis en évidence deux toxines : une thermo-labile, proche de la toxine cholérique, et une thermo-stable.

La toxine thermo-labile serait plus proche antigéniquement et sur le plan de l'activité biologique de la toxine cholérique que de la toxine LT des E. coli entérotoxino-gènes (Spira et Fedorka-Cray, 1983, 1984) ce qui a été confirmé par Dotevall et coll. (1985). Sanyal et coll. (1983) ont d'autre part observé un pouvoir invasif chez certaines souches de V. mimicus.

#### 4) V. parahaemolyticus :

Le pouvoir pathogène de ce Vibrio halophile a été démontré pour la première fois, au Japon, en 1950. Il est essentiellement responsable de gastro-entérites après consommation de coquillages ou de poissons insuffisamment cuits (Joseph et coll., 1982). Bien que d'évolution le plus souvent bénigne, les diarrhées observées peuvent avoir des conséquences graves par déshydratation.

Le mécanisme de la pathogénicité de V. parahaemolyticus est encore inconnu, malgré les nombreuses études qui lui ont été consacrées. L'observation d'un pouvoir hémolytique (phénomène de Kanagawa) de la majorité des souches isolées de selles diarrhéiques a amené Sakazaki et coll. (1968b) à établir une corrélation entre pouvoir pathogène et phénomène de Kanagawa (KP), d'autant que seules 1 % des souches isolées de l'environnement présentaient la même propriété. Cette observation a été confirmée par de nombreux auteurs (in Joseph et coll., 1982). L'hypothèse avancée par Sakazaki et coll. (1974) serait que les souches KP + se multiplient sélectivement dans l'intestin, au détriment des souches KP - pourtant ingérées en plus grand nombre.

Cependant, l'hémolysine ne peut expliquer le pouvoir pathogène de V. parahaemolyticus. Les recherches d'une toxigénèse ont apporté des résultats variables selon les auteurs mais aucune toxine n'a pu être véritablement identifiée (Joseph et coll., 1982).

D'autres facteurs de virulence, tels l'adhésion ou/et l'invasion cellulaire n'ont pas été clairement impliqués dans le mécanisme du pouvoir pathogène de V. parahaemolyticus. Nous reprendrons plus en détail cette discussion lors de l'étude de la pathogénicité de nos souches de V. parahaemolyticus.

5) V. vulnificus :

Désigné également sous le nom de "Vibrio-lactose positif", ce Vibrio halophile a fait preuve d'une pathogénicité particulière chez l'homme. Deux grands tableaux cliniques ont été décrits (Joseph et coll., 1982; Colwell, 1984) :

- a) septicémie consécutive à la consommation de coquillages contaminés, avec évolution fulgurante.
- b) surinfection de plaies, après contact avec de l'eau de mer ou des animaux marins.

La dissémination rapide de la bactérie dans tout l'organisme serait due à son pouvoir de résistance à la phagocytose (Kreger et coll., 1981). L'observation d'une cellulite, de lésions érythémateuses, de nécrose au niveau du derme a suggéré l'intervention d'un deuxième facteur de virulence. Kreger et Lockwood (1981) ont ainsi isolé une toxine extracellulaire, cytotoxique et protéasique.

Certains auteurs ont noté une prédisposition des insuffisants hépatiques aux infections par V. vulnificus (Shirouzu et coll., 1985).

6) V. fluvialis :

Autre Vibrio à l'origine de gastro-entérites, V. fluvialis a été isolé dans différentes régions du globe (Joseph et coll., 1982).

Le mécanisme exact de pathogénicité de V. fluvialis n'est pas encore connu. Cependant, plusieurs substances ont été mises en évidence, comme une entérotoxine (Seidler et coll., 1980) une cytolysine (Lockwood et coll., 1982) et une cytotoxine (Wall et coll., 1984).

V. furnisii, ancien biotype gazogène de V. fluvialis, a été également isolé de selles diarrhéiques (Brenner et coll., 1983).

7) V. alginolyticus :

V. alginolyticus est rarement impliqué dans des épisodes diarrhéiques, mais possède toutefois un certain pouvoir pathogène. Il est, en effet, possible de l'isoler dans des cas d'infections superficielles, telles que otites, conjonctivites, lésions de la peau, surinfections de plaies et de brûlures (in Blake et coll., 1980). Un contact avec de l'eau de mer est à l'origine de ces contaminations, avec cependant, des exceptions (Schmidt et coll., 1979).

8) V. damsela :

Décrit par Love et coll. en 1981, V. damsela a été reconnu responsable d'infections chez l'homme, en étroite relation avec le milieu marin. Il s'agit essentiellement, d'après une étude du Center of Diseases Control aux U.S.A., de surinfections de blessures (Morris et coll., 1982).

L'identification de deux types d'hémolysines secrétées par V. damsela n'a cependant pas apporté d'éléments décisifs quant à la compréhension du pouvoir pathogène (Clarridge et coll., 1985).

9) V. hollisae :

Egalement décrit récemment (Hickman et coll., 1982) V. hollisae montre une pathogénicité proche de V. cholerae non O<sub>1</sub>. Il est, en effet, isolé le plus souvent de selles diarrhéiques, et ces gastro-entérites se déclarent après consommation de coquillages (Morris et coll., 1982).

10) A. hydrophila :

Parallèlement à ce nombre croissant d'espèces de Vibrio rencontrées en pathologie humaine (dû certainement à une meilleure distinction des différentes espèces), une autre bactérie des écosystèmes hydriques et appartenant à la famille des Vibrionaceae, A. hydrophila, intervient de plus en plus souvent dans divers syndrômes infectieux chez l'homme (Davis et coll., 1978).

Cette bactérie est isolée le plus souvent dans des cas de diarrhées (Lyungh et coll., 1977; Agger et coll.; 1985, Von Graevenitz, 1980) mais également lors de septicémies à porte d'entrée intestinale (Picard et coll., 1984), utérine (Roche et coll., 1980) ou externe, par blessures en milieu hydrique (Fraire, 1978) ou après hémodialyse (Ramsay et coll., 1978). Des cas de méningites (Qadri et coll., 1967), d'endocardites (Davis et coll., 1978), de surinfections de plaies (Hanson et coll., 1977) ont été également reportés.

De nombreuses études ont été consacrées au mode de pathogénicité de A. hydrophila. Il est maintenant établi que certaines souches produisent une entérotoxine thermo-labile, non neutralisée par un sérum anti-toxine cholérique ou anti-entérotoxine LT de E. coli d'après certains auteurs (Lyungh et coll., 1981). Mais pour d'autres, il existe une communauté antigénique avec la toxine cholérique (Honda et coll., 1985b; James et coll., 1982).

La mise en évidence de cette entérotoxine peut être gênée par l'action d'une protéine cytotoxique, mais qui est dénaturée à température plus basse (56° C) que l'entérotoxine (60° C) (Lyungh et coll., 1977, 1981).

Cette entérotoxine serait moins active, à poids égal, que la toxine cholérique, bien que ses effets biologiques dans les différents modèles cellulaires et animaux testés soient identiques.

Mais d'après Cumberbatch et coll. (1979) l'effet entéropathogène serait dû à une toxine cytotoxique, différente de l'entérotoxine cytotonique. D'autre part, la relation entre origine diarrhéique des souches étudiées et pouvoir toxigène n'est pas toujours nettement établie : une étude de Turnbull et coll. (1984) rapporte seulement 56 % de souches toxigènes parmi des souches isolées de selles diarrhéiques.

De même, Morgan et coll. (1985) soulignent l'écart enregistré entre les résultats des tests classiques de virulence (cf. ci-après) et les diarrhées observées après administration orale à des volontaires de souches d'A. hydrophila.

Il convient de noter, que pour certains auteurs, le pouvoir entéropathogène serait associé à des caractères biochimiques particuliers, en l'occurrence la présence d'une lysine-décarboxylase et d'une réaction de Voges-Proskauer positive (Kaper et coll., 1981; Cumberbatch et coll., 1979). Burke et coll. (1983) ont proposé un schéma de détection des souches entéropathogènes de A. hydrophila basé sur une réaction de VP positive, une fermentation de l'arabinose négative et d'un test d'hémolyse d'érythrocytes de lapin.

La capacité d'adhésion de certaines souches de A. hydrophila a été mise en évidence sur cellules épithéliales buccales (Atkinson et Trust, 1980) et serait liée à la présence de pili. Selon le principe des tests d'hémagglutination utilisés pour E. coli, Adams et coll. (1983) rapportent 39 types différents en fonction du sucre inhibiteur, et du type d'érythrocytes.

Enfin, Lawson et coll. (1985) ont rapporté le pouvoir invasif de certaines souches en cultures de cellules HEp-2, montrant qu'un syndrome dysentérique peut être causé par A. hydrophila.

11) A. sobria :

A. sobria a été impliquée dans des épisodes diarrhéiques et la sécrétion d'une entérotoxine a été montrée (Turnbull et coll., 1984; Champsaur et coll., 1982). Une hémolysine et une cytotoxine sont également produites dans certains cas (Joseph et coll., 1979). Watson et coll. (1985) n'ont pas trouvé de corrélation nette entre l'entérotoxigénèse, le pouvoir invasif et l'hémagglutination fucose-résistante.

12) Pl. shigelloides :

Pl. shigelloides peut être rencontré en pathologie humaine, le plus souvent à l'origine de diarrhées (Tsukamoto et coll., 1978; Richard et coll., 1978). Quelques cas d'infection extra-intestinale ont été reportés (in Von Graevenitz, 1980). Le mécanisme de pathogénicité de Pl. shigelloides est encore inconnu : Pitarangsi et coll. (1982) ne trouvent pas d'effet cytotoxique, ni de pouvoir de dilatation iléale chez le lapin ou le souriceau.

En conclusion de cette revue bibliographique, nous constatons que les bactéries de la famille des Vibrionaceae ont pour pouvoir pathogène dominant le déclenchement de gastro-entérites. Mais nombre d'entre-elles se comportent également comme pathogènes opportunistes après contact avec le milieu marin, ou plus généralement, un milieu aquatique.

Les mécanismes de pathogénicité sont encore mal connus pour de nombreuses espèces et les résultats obtenus, fragmentaires.

Avant d'aborder l'étude du pouvoir pathogène de nos souches, nous passerons en revue les différentes méthodes utilisées pour la recherche d'un pouvoir entéro-pathogène.



B - Méthodes de mise en évidence d'un pouvoir entéropathogène :

Trois facteurs de virulence bactérienne peuvent intervenir dans le déclenchement d'un épisode diarrhéique :

- adhérence aux cellules intestinales permettant la colonisation de la muqueuse ;
- production de toxines ;
- invasion cellulaire.

L'adhérence bactérienne aux entérocytes est nécessaire, tandis que la production de toxines peut s'accompagner (Shigella) ou non (V. cholerae) d'une invasion cellulaire.

Pour la mise en évidence de ces facteurs de pathogénicité, différents modèles et tests sont employés :

1) adhésion cellulaire :

a) test d'adhérence à la bordure en brosse d'entérocytes de lapin :

Décrit par Cheney et coll. (1980), ce test in vitro apparaît contestable compte-tenu de la spécificité des récepteurs cellulaires intervenant dans l'adhésion.

b) cultures cellulaires :

Différentes lignées de cellules peuvent être employées :

- . cellules HeLa (hétéroploïdes d'un carcinome de col utérin)
- . cellules HFI (human fetal intestine)
- . cellules épithéliales buccales.

Après mise en contact brève de cultures bactériennes avec une culture cellulaire, on évalue au microscope la proportion de bactéries adhérentes.

c) hémagglutination :

Chez E. coli, les structures protéiques (pili ou fimbriae) responsables de l'adhésion sont également hémagglutinantes.

Selon les érythrocytes agglutinés (de mouton, de boeuf, de cobaye...) on peut les classer, ainsi que par leur résistance à cette agglutination en présence de mannose.

Le principe de ce test a été étendu aux Vibrio et Aeromonas (Reyes et coll., 1983, Atkinson et Trust, 1980; Burke et coll., 1984).

2) toxinogénèse :

Les tests les plus anciens sont réalisés sur animal, in vivo (Alouf, 1982).

a) modèles animaux :

- anse iléale ligaturée de lapin :

après injection de la souche bactérienne ou de la toxine isolée dans une anse ligaturée, on mesure l'augmentation de volume et de poids due à une accumulation de liquide dans la lumière intestinale : c'est le pouvoir de dilatation d'une anse ligaturée (PDAL). Ce test met en évidence le pouvoir entéropathogène d'une bactérie ou d'une toxine.

- souriceau nouveau-né :

l'inoculation intra-gastrique de la souche ou de la toxine isolée provoque une diarrhée dont l'importance est repérée par un colorant associé à l'inoculum. La prise de poids relative est également notée. Ce modèle a été décrit pour la recherche de la toxine thermo-stable de E. coli (Gianella, 1976).

- perméabilité vasculaire de la peau :

effectué le plus souvent chez le lapin, ce test mesure l'œdème formé au point d'injection de la toxine, celle-ci augmentant la perméabilité vasculaire.

b) tests cellulaires :

L'utilisation des tests de culture cellulaire s'est rapidement développée, grâce à leur facilité de mise en œuvre et à leur reproductibilité supérieure à celle des modèles animaux.

- cellules Y1 :

il s'agit de cellules surénales de souris, permettant la détection de toxine de type cholérique ou LT de E. coli (Donta et coll., 1974). La mise en contact avec un filtrat de culture bactérienne provoque un changement morphologique des cellules : elles s'arrondissent (effet cytotonique) et on note une augmentation de la production cellulaire de stéroïdes. On met ainsi en évidence l'effet activateur de la toxine sur l'AMP cyclique cellulaire.

- cellules CHO :

cellules ovariennes de hamster chinois. Le principe du test est le même, mais on observe ici un effilement des cellules (Guerrant et coll., 1975).

- cellules HeLa :

elles permettent de mettre en évidence un effet cytotoxique que l'on évalue par la proportion de cellules détruites. Sh. dysenteriae et Cl. perfringens produisent ce type de toxines (Keusch et Donta, 1975).

c) tests immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur l'antigénicité des toxines protéiques : il est possible de les faire réagir avec un anticorps connu. Les principales techniques sont les suivantes :

- ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) :

La réaction antigène/anticorps est visualisée grâce à l'addition d'une anti-globuline marquée de la phosphatase alcaline. On révèle l'enzyme à l'aide d'une réaction colorée lue au spectrophotomètre.

On peut utiliser, soit une anti-toxine cholérique, soit une anti-toxine LT de E. coli comme anticorps.

La sensibilité de cette technique est augmentée par fixation préalable du complexe antigène/anticorps sur des récepteurs membranaires GM<sub>1</sub> de la toxine (Sack et coll., 1980).

- RIA : (radio-immunosorbant assay) :

C'est un élément isotope qui est utilisé pour la révélation du complexe antigène/anticorps. Cette technique est peu utilisée, compte-tenu des difficultés de manipulation de tels composés.

d) techniques d'hybridation d'ADN :

Ces techniques génétiques mettent en évidence les séquences d'ADN codant pour une entérotoxine. Par action d'enzymes de restriction, une "sonde" est préparée à partir, soit du chromosome de V. cholerae O<sub>1</sub>, soit du plasmide de E. coli toxigène. Ce fragment d'ADN est alors marqué, soit par isotope, soit par une enzyme. L'hybridation éventuelle de la "sonde" avec l'ADN de la souche suspecte met en évidence le pouvoir toxigène de cette souches.

Ces nouvelles techniques restent à standardiser pour être appliquées en routine (Spira, 1984).

3) invasion cellulaire :

a) test de Séreny :

L'instillation d'une culture bactérienne sur la conjonctive d'un lapin ou d'un cobaye provoque en quelques jours l'apparition d'une kératoconjunctivite purrulente si la souche est invasive (Séreny, 1955). Il y a alors multiplication des bactéries à l'intérieur des cellules épithéliales.

b) cultures cellulaires :

Le pouvoir invasif d'une bactérie peut également être mis en évidence sur cellules Hela ou cellules épithéliales HEp-2 (Lawson et coll., 1985). On estime au microscope l'invasion intracellulaire des bactéries.

c) anse iléale ligaturée :

après le test du PDAL, on peut rechercher au microscope la pénétration des bactéries dans les cellules muqueuses intestinales (Robins-Browne et coll., 1977).

Cette série de tests, notamment pour la recherche d'entérotoxines, n'est pas réalisable en routine par un laboratoire non spécialisé. Les modèles "in vivo" sont particulièrement astreignants, bien que le PDAL reste un test de référence largement utilisé. Les tests cellulaires ont, semble-t-il, plus d'avenir, ainsi que les méthodes immunologiques (ELISA) qui ont pour atout leur spécificité. Les techniques d'hybridation d'ADN ne sont pas encore applicables à grande échelle, bien que très séduisantes dans leur principe.

Le problème qui se pose également est de caractériser précisément les facteurs de pathogénicité des bactéries de la famille des Vibrionaceae, de façon à adapter les tests de détection à un usage de routine.

La recherche d'un éventuel pouvoir pathogène humain des souches étudiées dans ce travail est orientée vers le risque entéropathogène, risque essentiel chez les Vibrionaceae comme nous l'avons vu précédemment.

C'est pourquoi, nous étudierons successivement :

- la production d'entérotoxine en culture cellulaire Y1 et par la technique immuno-enzymologique ELISA ;

- la production d'hémolysine par le phénomène de Kanagawa ;

- la capacité d'adhésion aux cellules Hela ;

- la capacité d'invasion cellulaire : test de Séreny.

Ces trois derniers tests ne seront réalisés que sur les souches de V. parahaemolyticus, à la suite de problèmes de conservation de la majorité de nos souches.

Enfin, l'étude de la résistance aux antibiotiques de ces souches isolées de l'environnement marin, apportera des éléments supplémentaires dans l'évaluation du risque sanitaire.

## II - RECHERCHE D'UNE ENTEROTOXINE

Nous avons utilisé deux tests pour cette recherche d'une toxine de type cholérique ou LT et E. coli.

### 1) Culture de cellule Y1 :

#### a) matériel et méthodes :

- les cellules Y1 (Flow LAB) sont entretenues en flacons pour culture cellulaire contenant 10 ml de milieu de HAM F<sub>10</sub> ( F l o w LAB ) dilué au 1/10° extemporanément, additionné de glutamine et d'antibiotiques : pénicilline 1 MU/1, dibécacine 50 mg/1 et colistine 1 MU/1. Lorsque le tapis cellulaire est confluent à 80 %, les cellules sont trypsinées avec un mélange trypsine à 2 % - EDTA et les boîtes sont dédoublées.

Le test est réalisé en plaque de microtitration, selon la technique de Sack et Sack (1975) : dans chaque puits sont répartis 200 µl de milieu de HAM contenant environ 10<sup>5</sup> cellules ; on incube 24 heures à 37° C de façon à obtenir un tapis de 50 à 80 % de cellules confluentes.

- les souches à étudier sont cultivées en bouillon trypticase-soja (annexe 2) à 37° C pendant 18 et 48 heures, avec agitation. Chaque bouillon est alors filtré sur filtre Millipore<sup>R</sup> de porosité 0,22 µm et le filtrat est recueilli.

- dans une plaque de microtitration, on réalise en PBS une gamme de dilution de toxine cholérique (SIGMA) à partir d'une solution-mère à 500 ng/ml. 50 µl de chaque filtrat sont répartis en double exemplaire (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> etc ...). Des témoins des milieux utilisés : HAM, PBS et bouillon trypticase sont représentés par 50 µl.

- à l'aide d'une pipette multi-canaux, on transvase le contenu de cette microplaque dans une microplaque de culture cellulaire Y1.

Après incubation de 10 minutes à 37° C on élimine le surnageant et après deux lavages des puits en PBS, on répartit 200 µl de milieu de HAM dans chaque puits.

La microplaque est remise en culture 18 heures à 37° C et la lecture se fait au microscope inversé (x 40). On détermine l'effet cytotonique (arrondissement des cellules), ou l'effet cytotoxique (aspect granuleux et crénelé). La coloration au bleu trypan facilite la lecture, en colorant les cellules mortes.

#### b) Résultats et discussion :

On observe un effet cytotonique de la toxine cholérique sur les cellules Y1 jusqu'à une concentration de 4 ng de toxine cholérique.

Un essai est considéré comme positif lorsque 50 % ou plus des cellules montrent un effet cytotonique.

Aucune des 117 souches étudiées ne présente d'effet cytopathogène (cytotonique ou/et cytotoxique) que ce soit après 18 ou 48 heures de culture. Ces deux temps d'incubation des bouillons bactériens ont été testés, car d'après Sack et Sack (1975), la sensibilité de la détection de l'entérotoxine augmente avec la durée d'incubation, l'optimum se situant à 48 heures.

L'utilisation de culture cellulaire surrénalienne Y1 pour la recherche d'entérotoxine chez les Vibrionaceae (mis à part V. cholerae) a permis de mettre en évidence un effet cytotoxique et cytotonique (après chauffage 10 minutes à 56° C) chez des souches d'A. hydrophila (Joseph et coll. (1979) - Cumberbatch et coll. (1979)) ainsi que chez V. fluvialis (Seidler et coll. 1980).

Par contre, V. parahaemolyticus et V. alginolyticus ne montrent pas d'effet cytopathogène en cellules Y1 (Donta et Smith, Manevall et coll., in Joseph et coll., 1982; Twedt et coll., 1981).

Il est intéressant, de plus, de connaître l'importance des souches toxigènes isolées de l'environnement (eau, coquillages, sédiments) par opposition aux souches cliniques. Dans une étude consacrée à A. hydrophila dans la Chesapeake Bay, Kaper et coll. (1981), trouvent 71 % de souches cytotoxiques en culture cellulaire Y1. D'autre part, 8 souches de V. fluvialis (groupe F) sur 16 se montrent cytotoxiques (à des degrés divers) pour les cellules Y1 et deux souches produisent un effet cytotonique, selon une étude dans la baie de New-York (Seidler et coll., 1980).

On le voit, des souches isolées de l'environnement peuvent être porteuses d'un potentiel toxigène dans des proportions non négligeables, bien que cela n'apparaisse pas dans notre échantillonnage.

## 2) Technique ELISA

### a) matériel et méthodes

- les souches bactériennes sont ensemencées dans 2 ml de bouillon BHI (DIFCO) (annexe 2) et mises à incuber à 37° C avec agitation pendant 24 et 48 heures. Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 4 000 tours/mn et les surnageants récupérés.



- obtention d'anticorps anti-toxine cholérique : on vaccine un lapin albinos de 3 kg par injection intra-musculaire dans la patte arriè̀re, de 1 ml d'une solution aqueuse de toxine cholérique purifiée (SIGMA) à 100 µg/ml additionné de 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (SIGMA).

Des rappels sont faits à J<sub>21</sub> et J<sub>40</sub>.

Le contrôle de l'immunisation est fait par un test d'Ouchterlony (précipitation antigène/anticorps en milieu gélosé). Après ponction intra-cardiaque, le sang (environ 60 ml) est centrifugé. On recueille le sérum et on le répartit en aliquots de 3 ml qui sont conservés à -20° C.

- principe de la technique GMI-ELISA :

- \* la première étape est la fixation du ganglioside GM<sub>1</sub> sur le support, en l'occurrence la microplaque de titration
- \* addition des surnageants bactériens : toxine se fixant sur les récepteurs GM<sub>1</sub>.
- \* addition d'anticorps anti-toxine cholérique.
- \* addition d'une anti-globuline de lapin marquée à phosphatase alcaline.

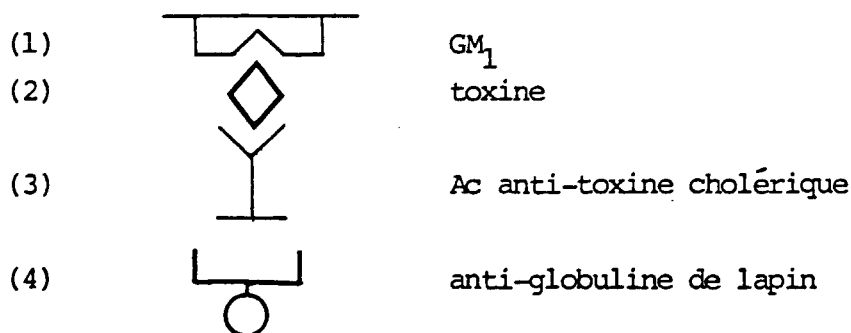


Fig. 13 : principe de la technique ELISA .

- protocole expérimental :

\* On répartit 200 µl d'une solution de GM<sub>1</sub> à 1, 5 µg/ml en PBS dans les puits d'une microplaque. Après incubation 18 heures à 25° C, on effectue 3 lavages en PBS.

\* 200 µl de surnageant de culture sont répartis dans les puits et on réalise également une gamme de dilution de toxine cholérique à partir d'une solution-mère à 1 mg/ml. Des témoins (4) BHI sont également effectués. Les plaques sont mises 1 h 30 à l'étuve à 37° C.

\* après 3 lavages, on ajoute 200 µl par puits d'une dilution au 1/500° du sérum (Ac) en tampon (Behring PA). On incube 1 heure à 37° C et on lave 3 fois.

\* on répartit 100 µl d'une dilution au 1/1 000° du conjugué anti-globuline/phosphatase alcaline, dans chaque puits : incubation 1 heure à 37° C puis trois lavages.

\* la révélation de l'enzyme se fait par du paranitrophénylphosphate (SIGMA) (1 pastille dans 5 ml de tampon) réparti à raison de 100 µl par puits.

\* après 45 minutes d'incubation à 25° C, la coloration jaune qui s'est développée est lue par mesure de la densité optique (DO) à 405 nm.

#### b) Résultats et discussion

Nous n'avons enregistré aucun résultat positif pour les 117 souches étudiées. La sensibilité de la technique a été déterminée à 4 ng de toxine cholérique (DO > 0,40).

La technique ELISA est une technique récente, en ce qui concerne son application à la détection d'entérotoxines.

Elle a été décrite pour E. coli (Yolken et coll., 1977) puis a été élargie aux Vibrio (Sack et coll., 1980; Spira et Fedorka-cray, 1983).

La mise en évidence d'une communauté antigénique entre la toxine cholérique et une toxine de A. hydrophila par James et coll. (1982) est confirmée par Honda et coll. (1985b) qui emploient la technique ELISA. Il faut noter que ces résultats sont en contradiction avec ceux de Luangh et coll. (1981) qui n'avaient pu neutraliser les effets en PDAL et en cellules Y1 de l'entérotoxine sécrétée, par un sérum anti-toxine cholérique. Sans doute existe-t-il, au delà des problèmes de technique, des dissemblances parmi les souches entérotoxigènes d'une même espèce quant aux facteurs de virulence, expliquant les divergences observées entre les auteurs.

La technique ELISA apparaît prometteuse en raison de sa sensibilité, de sa facilité de mise en oeuvre et de sa spécificité. Elle sera sans doute de plus en plus employée en routine, pour la détection de toxines connues.

Cette technique semble, paradoxalement moins utilisée pour les Vibrio que pour les Aeromonas.

### III - PHENOMENE DE KANAGAWA

L'activité hémolytique de V. parahaemolyticus sur gélose hypersalée de Wagatsuma est appelé phénomène de Kanagawa (Sakazaki et coll., 1968).

#### 1) Matériel et méthodes :

Les souches de V. parahaemolyticus sont ensemencées en bouillon BHI (annexe 2) de 5 ml et incubés 18 heures à 37° C.

Les boîtes de gélose de Wagatsuma sont préparées la veille, selon la formule donnée en annexe 2. On repique chaque bouillon par un dépôt en "spot" sur gélose de Wagatsuma, à raison de 6 spots par boîte. Après séchage de la surface, les boîtes sont mises à incuber 18 heures à 37° C.

Les souches Kanagawa-positives (KP +) présentent une zone d'hémolyse  $\beta$  autour du spot de culture bactérienne alors que les souches KP - ne créent aucune hémolyse.

La souche de V. parahaemolyticus 51-79 (aimablement fournie par le Professeur RICHARD, Institut Pasteur, Paris) est utilisée comme témoin positif.

## 2) Résultats et discussion

14 souches de V. parahaemolyticus ont été étudiées, se répartissant comme suit :

- 6 souches saccharose -  
 - 5 " " +  
 - 4 " " + et -, non prises en compte dans l'étude phénotypique mais isolées d'eau et de coquillages. Aucune de ces 14 souches n'a présenté de caractère d'hémolyse sur gélose de Wagatsuma.

L'hémolysine mise en évidence dans le phénomène de Kanagawa est une hémolysine thermostable, ayant une antigénicité différente de celle de l'hémolysine thermolabile présente à la fois chez les souches KP + et KP - comme l'ont montré de nombreuses études rapportées par Joseph et coll. (1982). Il s'agit d'une protéine, dénaturée par chauffage à 60° mais retrouvant son activité toxique à 100° C. Ce phénomène paradoxal peut s'expliquer par un changement de conformation de la molécule (Ohta, 1975, in Joseph et coll., 1982).

Les effets biologiques de cette hémolysine ont été étudiés par de nombreux auteurs. C'est ainsi qu'elle a été trouvée cytotoxique pour les cellules HFI (Sakurai et coll., 1976). La relation entre phénomène de Kanagawa et un PDAL n'est pas constante comme l'ont montré Sakazaki et coll. (1974), Brown et coll. (1977), et le rôle de l'hémolysine dans la pathogénicité de V. parahaemolyticus est encore inconnu.

La mise en évidence du phénomène de Kanagawa a suscité de nombreuses études, dont certaines ont montré l'importance du pH du milieu de culture (5,5 à 6,5 optimum) dans la production de l'hémolysine thermo-stable ; condition de pH obtenue d'ailleurs par la fermentation du mannitol en gélose de Wagatsuma (Cherwonogrodzky et Clark, 1981). Le rôle indispensable de certains acides aminés, tels la sérine et l'acide glutamique a également été observé par Karunasagar (1981) qui a proposé un milieu synthétique pour la production des deux hémolysines de V. parahaemolyticus.

Enfin, une technique immunologique (test d'Eleck modifié) a été proposé par Honda et coll. (1980) pour la détection de l'hémolysine thermostable.

Le phénomène de Kanagawa est depuis longtemps considéré comme le témoin de la pathogénicité de certaines souches de V. parahaemolyticus. Mais il s'agit essentiellement d'une constatation épidémiologique : les souches isolées de selles diarrhéiques sont le plus souvent KP +, alors que les souches isolées de l'environnement sont KP - (revue de nombreuses études dans Joseph et coll., 1982). Des exceptions, cependant ont été signalées (Saha et coll., 1982; Johnson et coll., 1984; Barker, 1974).

Nos résultats sont donc en accord avec la majorité des études, puisque nos souches, isolées d'eau et de coquillages, sont Kanagawa négatives. Rappelons l'hypothèse de Sakazaki et coll. (1974) s'appuyant sur les cinétiques de croissance à 37° et 25° C de souches KP + et KP -. La croissance plus rapide des souches KP + à 37° C

favoriserait leur développement dans l'intestin, par rapport aux souches KP - pourtant présentes dans l'aliment ingéré. Ce schéma n'a pas reçu de confirmation, ni d'infirmer d'autres auteurs.

Sur le plan génétique, Kaper et coll. (1984) ont montré par hybridation d'ADN que les souches de V. parahaemolyticus KP - ne possédaient pas les gènes codant pour l'hémolysine thermostable.

A l'heure actuelle, on ne connaît toujours pas la relation entre pathogénicité et phénomène de Kanagawa. Des études concernant d'autres facteurs de virulence associés à l'hémolysine sont nécessaires.

#### **IV - ADHESION CELLULAIRE**

##### **1) Matériel et méthodes**

L'adhésion a été recherchée sur culture de cellules HeLa. Les cellules proviennent du laboratoire de Virologie du CHR de Rennes et sont entretenues en milieu minimum de Eagle additionné de glutamine, de bicarbonate de sodium, de sérum de veau foetal (10 %) et d'antibiotiques :

- dibékacine 70 mg/l
- colistine 1 MUI/l
- benzylpénicilline 1 MUI/l .

Les cellules sont dédoublées une fois par semaine par action d'un mélange versène-trypsine (100 ml de versénate de sodium à 1/5000e + 2 ml de trypsine au 1/50e).

A partir d'une culture en boîte de Falcon, on prépare des tubes de Leighton (à lamelle) : après trypsination du tapis cellulaire, on ajuste la concentration à 100 000 cellules par ml par comptage en cellule de Nageotte. 2 ml sont répartis dans chaque tube de Leighton. Les tubes sont utilisables lorsque le tapis cellulaire s'est reformé (environ 2 jours à 37° C).

- les souches de V. parahaemolyticus sont cultivées en bouillon trypticase-soja (annexe 2) pendant 18 heures à 37° C. Après centrifugation 10 minutes à 5.000 tours/mn, les bactéries sont remises en suspension dans 7 ml de PBS. L'opération est renouvelée 2 fois.

- les cultures cellulaires sont lavées en PBS, 3 fois. On introduit dans chaque tube de Leighton 1 ml de suspension bactérienne ( $10^6$  bactéries). Le contact a lieu pendant 20 mn à 37° C en ayant soin d'incliner les tubes.

Après ce temps, les lamelles sont fixées au méthanol, séchées, rincées à l'éthanol et de nouveau séchées. On effectue alors une coloration de Giemsa (15 minutes) suivie d'une décoloration à l'éthanol, rinçage à l'eau et nouvelle coloration à la fuschine de Zielh (3 minutes). Les lamelles sont ensuite montées sur lame et la lecture se fait aux objectifs x 40 et x 100 à immersion.

Une souche de Sh. sonnei est utilisée comme témoin positif.

## 2) Résultats et discussion

Selon le nombre moyen de bactéries associées à une cellule (50 cellules étant lues) on note de + à +++ :

+	=	10 à 20	bactéries	par	cellule
++	=	20 à 30	"	"	"
+++	=	30 à 50	"	"	"
-	<	10	"	"	"

Les résultats obtenus pour les 14 souches de V. parahaemolyticus étudiées (cf. précédemment) sont reportés dans le tableau ci-après :

TABLEAU X : adhésion sur cellules HeLa.

SOUCHE	ADHESION Cellules HeLa
33	-
S* - 67	-
" - 68	-
" - 69	-
" - 70	-
" - 71	+
S + 67	++
" + 68	-
" + 69	-
" + 70	-
" + 71	-
S + A	+
S + B	-
S + C	-
S - C	+
Sh. sonnei	+++

\* saccharose

4 souches se révèlent douées d'un pouvoir d'adhésion aux cellules HeLa à des degrés divers, mais néanmoins inférieurs à celui de la souche témoin de Sh. sonnei.

Il n'existe apparemment pas de relation entre ce pouvoir d'adhésion et la fermentation du saccharose, puisque 2 souches sont saccharose + et 2, saccharose -. Il est également intéressant de noter que les deux biotypes, saccharose - et saccharose + issus d'une même souche (n° 67, 71 ou C) ne présentent pas la même capacité d'adhésion cellulaire. Cette propriété serait en fait très variable selon les individus, au sein même d'une "souche".



Ces résultats sont légèrement différents de ceux de Carruthers (1977) : aucune souche de V. parahaemolyticus Kanagawa négatif n'adhérait à des cellules HeLa, alors que les souches Kanagawa positif étaient adhérentes. Rappelons que toutes nos souches sont Kanagawa négatif. Iijima et coll. (1981) trouvent indifféremment des souches KP + et KP - adhérentes.

Merrell et coll. (1984) observent l'adhésion d'une souche Kanagawa positive uniquement sur des cellules dégénératives (HeLa, HBC, HFI) s'arrondissant et se décollant. D'après ces mêmes auteurs, l'adhérence serait consécutive, et non préalable à l'effet nécrotique observé chez les cellules.

Des études portant sur d'autres lignées cellulaires ont donné des résultats variables, mais aucune corrélation entre le phénomène de Kanagawa et l'adhésion cellulaire n'a pu être mise en évidence (Gringas et Howard, 1980; Reyes et coll., 1983). Cependant, Hackney et coll. (1980) rapportent que des souches isolées de diarrhées adhèrent plus fortement à des cellules HFI que des souches de l'environnement, quel que soit le phénomène de Kanagawa.

Enfin, pour Carruthers (1977) la présence d'ions  $Ca^{++}$  et d'un sucre au niveau de la paroi bactérienne est indispensable à l'adhésion sur cellules.

## V - INVASION CELLULAIRE

Le pouvoir invasif de nos souches de V. parahaemolyticus a été recherché grâce au test de Séreny.

### 1) Matériel et méthodes :

Les souches de V. parahaemolyticus sont cultivées en bouillon BHI (annexe n° 2) durant 18 heures à 37° C. Une goutte (0,05 ml) de bouillon est instillée dans le pli conjonctival de cobayes albinos de 250 g. L'oeil gauche est seul inoculé, le droit servant de témoin.

Un témoin bouillon BHI stérile est réalisé ainsi qu'un témoin positif, correspondant à une culture de Sh. sonnei. (Hôpital Fontenoy, Rennes).

Le développement d'une kérato-conjonctivite purrulente est surveillée chaque jour durant 15 jours.

## 2) Résultats et discussion :

Aucune des 14 souches de V. parahaemolyticus étudiées n'a provoqué de kérato-conjonctivite chez le cobaye. Nous n'avons, également, pas obtenu de résultat positif avec Sh. sonnei malgré l'inoculation de plusieurs animaux, à diverses reprises. Sansonetti et coll. (1981) ont montré que le pouvoir invasif de Sh. sonnei était sous la dépendance d'un plasmide. La perte de ce plasmide provoque le passage de la forme 1, virulente, à la forme 2, non-virulente, avec perte des antigènes 0 somatiques. Il semblerait donc que notre souche de Sh. sonnei ait perdu ce plasmide de virulence.

Le test de Séreny est un test classique pour la recherche du pouvoir invasif bactérien. Sa sensibilité a cependant été remise en cause pour l'étude de Salmonella (Formal et coll., 1983) et d'Aeromonas (Watson et coll., 1985). Les cultures de cellules épithéliales apparaissent plus sensibles que ce test in vivo.

Le fait que certaines diarrhées à V. parahaemolyticus soient de type dysentérique avec présence de leucocytes et de mucus dans les selles (Hughes et coll., 1978a; Bolen et coll., 1974) laisse penser qu'un pouvoir invasif existe.

Calia et Johnson (1975) ont montré une invasion des cellules épithéliales de l'intestin chez des lapereaux nouveaux-nés, par V. parahaemolyticus Kanagawa +.

Par contre, des souches Kanagawa + et Kanagawa - ont été trouvées invasives chez le lapin par Boutin et coll. (1979).

Le test de Séreny est négatif pour V. parahaemolyticus (in Joseph et coll., 1982). Carruthers (1975) a observé un effet cytotoxique sur cellules HeLa mais qui ne semblait pas lié à un phénomène d'invasion cellulaire.

Les divergences observées remettent en question le choix du modèle utilisé, en l'occurrence le test de Séreny. Le recours à d'autres modèles animaux, tels le lapin nouveau-né ou le PDAL avec une étude histologique des cellules intestinales est astreignant. D'autre part, aucune étude comparative entre test de Séreny et ces modèles animaux n'a été menée pour V. parahaemolyticus.

## VI - RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L'étude de la résistance aux antibiotiques est intéressante, non seulement dans l'optique d'un traitement en cas d'infection chez l'homme, mais aussi dans l'hypothèse de transferts de résistance de bactérie à bactérie. En effet, des transferts de matériel génétique, en l'occurrence des plasmides, peuvent intervenir entre bactéries d'une même espèce, mais également entre bactéries de familles différentes. La possibilité de tels échanges, en zone marine littorale, entre flore autochtone et flore d'origine terrestre (entérique ou autre) peut avoir des conséquences sur le plan sanitaire. Ainsi, une bactérie potentiellement pathogène (Salmonella, E. coli, Vibrio ...) qui acquiert une résistance à un ou plusieurs antibiotiques verra sa virulence augmenter.

C'est pourquoi nous avons voulu évaluer le taux de résistance aux antibiotiques des souches de cette étude.

### 1) Matériel et méthodes

Les antibiogrammes ont été réalisés selon la méthode des disques, sur milieu de Mueller-Hinton (annexe 2).

Les boîtes sont ensemencées par "inondation" de 2 ml d'une suspension bactérienne ( $10^6$  bactéries/ml) en eau salée à 0,9 ‰. Les 18 antibiotiques testés, la charge des disques (Institut Pasteur Production), et les diamètres critiques sont présentés dans le tableau XI.

	Charge	diamètres critiques en mm		Charge	diamètres critiques en mm
<u>Pénicillines :</u>			<u>Divers :</u>		
ampillicine	10 µg	11-17	chloranphénicol	30 µg	19-23
carbénicilline	100 µg	13-15	doxycycline	30 µg	17-19
mezlocilline	75 µg		érythromycine	15 µg	17-22
<u>Céphalosporines :</u>			colistine	50 µg	15
cefalotine	30 UI	12-18	acide nalidixique	30 µg	15-20
céfoxitine	30 µg	15-22	triméthoprime-		
céfotaxime	30 µg	15-21	sulfaméthoxazole	80 µg	10-16
<u>Aminosides</u>					
kanamycine	30 UI	15-17			
gentamycine	10 UI	14-16			
tobramycine	10 µg	14-16			
amikacine	30 µg	15-17			
dibécacine	10 µg	14-16			

Tableau XI : Charge des disques d'antibiotiques utilisés, et diamètres critiques des zones d'inhibition.

Après incubation 24 heures à 37° C, on mesure les diamètres des zones d'inhibition, et l'on interprète ces mesures en "résistant", "limite" ou "sensible", selon les diamètres critiques de chaque antibiotique. Les souches limites sont regroupées avec les souches résistantes, lors de l'interprétation des résultats.

## 2) Résultats et discussion :

Le nombre de souches résistantes, pour chaque antibiotique testé, est reporté sur le tableau XII, en fonction de leur identification et de leur lieu d'isolement.

On remarque une sensibilité générale aux aminosides, ainsi qu'à la céfotaxine, au chloramphénicol, à l'acide nalidixique, et au triméthoprime-sulfaméthoxazole, ceci quel que soit le genre bactérien.

Par contre, l'ensemble des souches est résistant à l'érythromycine (activité prévisible), mais également à l'ampicilline.

Le comportement vis-à-vis des autres antibiotiques testés est plus nuancé :

- pénicillines : on note une forte proportion de vibrio résistants à la carbéniciline, exceptées les souches isolées de l'estuaire de la Vilaine. Ce sont également des Vibrio (13 sur 54), qui présentent la plus grande résistance à la mezlocilline.

- céphalosporines : par contre, les Aeromonas se montrent nettement plus résistants à la céfalotine. L'activité des céphalosporines de 2ème et 3ème génération (céfoxitine et céfotaxine), est supérieure à celle des céphalosporines de 1ère génération (céfalotine). On remarque cependant que plus de la moitié des Vibrio isolés de la baie de St. Brieuc sont résistants à la céfoxitine, ainsi que les 5 souches non identifiées provenant de Brest.

- la résistance à la doxycycline ne concerne que 3 souches (1 Vibrio, 1 Aeromonas, 1 non identifiée).

- enfin, la colistine est tolérée par environ 20 % des souches de Vibrio.

**TABLEAU XII** : Nombre de souches résistantes en fonction de leur identification (classification numérique).

	<u>Vibrio</u>			<u>Aeromonas</u>		non identifiés	
	Brest 54	St Brieuc 9	Vilaine 5	Brest 14	St Br. 18	Brest 5	St Br. 3
ampicilline	53	9	4	12	18	5	3
carbénicilline	43	8	0	6	11	2	1
mezlocilline	13	1	0	1	1	2	0
céfalotine	4	1	0	11	17	1	2
céfoxitine	5	5	1	2	3	5	1
céfotaxine	0	0	0	0	0	0	0
kanamycine	0	0	0	0	0	0	0
gentamycine	0	0	0	0	0	0	0
tobramycine	0	0	0	0	0	0	0
amikacine	0	0	0	0	0	0	0
dibékacine	0	0	0	0	0	0	0
doxycycline	0	1	0	1	0	0	1
chloramphénicol	0	0	0	0	0	0	0
érythromycine	54	9	5	13	18	5	3
colistine	11	1	2	0	0	0	0
ac. nalidixique	1	0	0	0	0	0	0
Trim. sulfa.	0	0	0	0	0	0	0

En résumé, à côté de la résistance commune à 2 antibiotiques (ampicilline et érythromycine), les souches étudiées présentent un comportement différent selon le genre auquel elles appartiennent :

- 81 % des Vibrio sont résistants à la carbénicilline
- 87,5 % des Aeromonas " " la céfalotine
- 75 % des souches non identifiées sont résistantes à la céfoxitine.

On ne note pas, au sein d'un même genre bactérien, d'écart important selon la zone géographique d'origine.

Les caractères de résistance aux antibiotiques chez les Vibrionaceae sont assez constants. V. cholerae est le plus souvent sensible à de nombreux antibiotiques, mais l'utilisation intensive des tétracyclines et du triméthoprim-sulfaméthoxazole dans le traitement prophylactique et curatif du choléra, a fait apparaître des souches multi-résistantes porteuses de plasmides (OMS, 1981; Glass et coll., 1980; Dupont et coll., 1985).

V. parahaemolyticus, V. alginolyticus et V. damsela, parmi les Vibrios halophiles, se montrent généralement résistants à l'ampicilline, la carbénicilline et la polymyxine B, d'après Joseph et coll. (1982), Morris et coll. (1983), ce que nous avons constaté également.

Mais les résultats sont divergents selon les auteurs : Twedt et coll. (1981) observent une majorité de souches de V. parahaemolyticus sensibles à l'ampicilline. Hada et Sizemore (1984) trouvent des pourcentages très élevés de résistance à divers antibiotiques, chez 543 souches de Vibrio spp, notamment à la bacitracine (89,2 %), la kanamycine (88,7 %), et la streptomycine (82,8 %) ; par contre, seules 34,3 % des souches sont résistants à l'ampicilline.

La présence de plasmide de multi-résistance a été mise en évidence chez V. parahaemolyticus (Arai et coll., 1985) : les résistances codées concernent l'ampicilline, la tétracycline, la streptomycine, la kanamycine, le chloramphénicol, le triméthoprim et le 0/129.

V. fluvialis est en général résistant à l'ampicilline, la carbénicilline et la polymyxine B (Brenner et coll., 1983).

Les souches d'A. hydrophila isolées de l'environnement (eau, sédiment) se révèlent résistants à l'ampicilline (Seidler et coll., 1980), à la tétracycline et polymyxine B (souches de la Chesapeake Bay, U.S.A.), tétracycline chloramphénicol et streptomycine (souches

de Dacca, Bangladesh) : Mc Nicol et coll. (1980). Ces mêmes auteurs soulignent que 57 % de ces souches originaires du Bangladesh portent une résistance couplée, streptomycine/tétracycline.

La résistance à la céfalotine que nous observons chez nos souches d'Aeromonas (87,5 %) n'est pas mentionnée dans la littérature, tout au moins pour des souches de l'environnement.

### 3) Conclusion :

La famille d'antibiotiques présentant le moins d'activité inhibitrice sur les souches étudiées sont les  $\beta$ . lactamines, notamment les pénicillines. La résistance massive à l'ampicilline et, dans une moindre mesure, à la carbénicilline, rend probable la production de  $\beta$ . lactamases par ces bactéries.

Les souches de cette études ne présentent pas une forte résistance aux antibiotiques, puisque les céphalosporines de 2ème et 3ème génération, les aminosides, les tétracyclines, le chloramphénicol, la colistine, l'acide nalidixique et le triméthoprim-sulfaméthoxazole se montrent actifs.



## CONCLUSION

Les bactéries de la famille des Vibrionaceae isolées de différentes zones du littoral breton se répartissent, après classification numérique en trois grands groupes phénotypiques : Vibrio, Aeromonas et indéterminées. Malgré les limites de cette étude, on peut estimer que l'utilisation de galeries API 20E pour l'identification de ce type de bactéries nécessite d'y associer la recherche de la mobilité, de l'halophilie et de la sensibilité au composé vibriostatique O/129. 26,5 % des souches ne sont pas identifiées par le système API, elles se répartissent cependant dans les trois groupes phénotypiques observés.

Il apparait d'autre part que le caractère de fermentation du saccharose ne peut être considéré comme discriminant (comme le fait API) pour séparer V. parahaemolyticus de V. alginolyticus, compte tenu de son instabilité. Les souches de V. parahaemolyticus ne se regroupent d'ailleurs pas en phénon distinct des autres Vibrios. L'instabilité du caractère saccharose n'est pas liée à la présence de prophages ou de plasmides. L'intervention d'un transposon "mutagène" semble l'hypothèse la plus vraisemblable.

La classification numérique a également montré l'hétérogénéité de la flore isolée, notamment en baie de St Brieuc. Il n'y a pas prolifération d'un biotype particulier, dans aucune des trois zones étudiées (rade de Brest, baie de St Brieuc, estuaire de la Vilaine), minimisant le risque lié à un déséquilibre de flore.

En ce qui concerne l'étude du pouvoir pathogène humain, on retiendra qu'aucune souche ne sécrète de toxine de type cholérique ou LT de E. coli. La résistance aux antibiotiques concerne essentiellement les pénicillines, les autres familles se montrant actives. Ces souches de Vibrionaceae ne sont donc pas porteuses d'un fort potentiel entéropathogène pour l'homme.

Le cas des souches de V. parahaemolyticus que nous avons étudiées plus en détail est différent, puisque 4 sont capables d'adhésion cellulaire (première étape de la colonisation intestinale). Ce facteur de virulence est associé à un phénomène de Kanagawa négatif, une non-invasion cellulaire et à une absence de production d'entérotoxine.

Le fait que ces souches aient été isolées de moules augmente le risque sanitaire lié à leur consommation.

En France, le contrôle de salubrité des coquillages et plus généralement, des produits de la mer, ne comprend ni la recherche de V. parahaemolyticus, ni d'autres Vibrios, tels V. cholerae, V. vulnificus, dont le pouvoir pathogène a pourtant été reconnu aux USA, au Japon ...

Un cas autochtone de gastro-entérite à V. parahaemolyticus a été décrit en 1983 par Boudon et coll., à Brest, mais l'origine de la contamination n'a pas été mise en évidence avec certitude.

En résumé, cette étude a permis de mettre en évidence une flore équilibrée de Vibrionaceae, dans chaque zone d'étude, et ne présentant pas de facteur majeur de virulence pour l'homme.

B I B L I O G R A P H I E

- ADAMS, D., ATKINSON, H. M., and WOODS, W. H.  
*Aeromonas hydrophila* typing scheme based on patterns of agglutination with erythrocytes and yeast cells.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1983, 17 : 422-427.
  
- AGGER, W. A., Mac CORMICK, J. D., and GURWITH, M. J.  
Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1985, 21 : 909-913.
  
- ALLEN, D. A., AUSTIN, B. and COLWELL, R. R.  
*Aeromonas media*, a new species isolated from river water.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, 33 : 599-604.
  
- ALOUF, J. E.  
Toxines protéiques, Chap. 9, dans LE MINOR, L. et VERON, M.  
Bactériologie médicale, 1982, Flammarion Médecine-Science, Paris.
  
- ARAI, T., ANDO, T., KUSAKABE, A., and ULLAH, A.  
Plasmids in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Japan and Bangladesh with special reference to different distributions.  
*Microbiol. Immunol.*, 1983, 27 : 1021-1029.
  
- ARAI, T., HAMASHIMA, H., and HASEGAWA, H.  
Isolation of a new drug-resistance plasmid from a strain of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Microbiol. Immunol.*, 1985, 29 : 103-112.
  
- ATKINSON, H. M., and TRUST, T. J.  
Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*.  
*Infect. Immun.*, 1980, 27 : 938-946.
  
- AYRES, P. A., and BARROW, G. I.  
The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in British coastal waters : report of a collaborative study 1975-6.  
*J. Hyg., Camb.*, 1978, 80 : 281-294.
  
- BARKER, W. H., Jr.  
*Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States.  
*Lancet*, 1974, i : 551-554.
  
- BAUMANN, P., BAUMANN, L., and MANDEL, M.  
Taxonomy of marine bacteria : the genus *Beneckeia*.  
*J. Bacteriol.*, 1971, 107 : 268-294.

- BAUMANN, P., BAUMANN, L., and REICHEL, J. L.  
Taxonomy of marine bacteria : *Beneckeia parahaemolytica* and *Beneckeia alginolytica*.  
*J. Bacteriol.*, 1973, 113 : 1144-1155.
  
- BAUMANN, P., BAUMANN, L., BANG, S. S., and WOOLKALIS, M.J.  
Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia* and *Photobacterium* :  
abolition of the genus *Beneckeia*.  
*Curr. Microbiol.*, 1980, 4 : 127-132.
  
- BELAS, R., MILEHAM, A., SIMON, M., and SILVERMAN, M.  
Transposon mutagenesis of marine *Vibrio* spp.  
*J. Bacteriol.*, 1984, 158 : 890-896.
  
- BERGEY'S MANUAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Vol. 1.  
BAUMANN and SCHUBERT, p. 516-550.  
1984. 9th ed. WILLIAMS and WILKINS, Baltimore, MD
  
- BLAKE, P. A., WEAVER, R. E., and HOLLIS, D. G.  
Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*.  
*Ann. Rev. Microbiol.*, 1980, 34 : 341-367.
  
- BOLEN, J. L., ZAMISKA, S. A. and GREENOUGH, W. B.  
Clinical features in enteritidis due to *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Am. J. Med.*, 1974, 57 : 638-641.
  
- BOUDON, A., RICHARD, C., et LE CORRE, C.,  
Premier cas autochtone de syndrome diarrhèique à *Vibrio parahaemolyticus*  
en France. Données bactériologiques, cliniques et épidémiologiques.  
*Méd. Mal. Infect.*, 1983, 13 : 443-447.
  
- BOUTIN, B. K., TOWNSEND, S. F., SCARPINO, P. V. and TWEDT, R. M.  
Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits  
by immunofluorescence.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1979, 37 : 647-653.
  
- BOUVET, P., CHATELAIN, R., et RIOU, J. Y.  
Intérêt du composé vibriostatique O/129 pour différencier les genres  
*Staphylococcus* et *Micrococcus*.  
*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1982, 133 B : 449-453.
  
- BRENNER, DON J., HICKMAN-BRENNER, F. W., LEE, J. V., STEIGERWALT, A. G.,  
FANNING, G. R., HOLLIS, D. G., FARMER III, J. J., WEAVER, R.E.,  
JOSEPH, S. W., and SEIDLER, R. J.  
*Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new  
species isolated from human feces and the environment.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1983, 18 : 816-824.

- BRISOU, J. F.  
Les bactéries marines, 1980, Masson (éd.), Paris.
  
- BROWN, A. D.  
Microbial water stress,  
*Bacteriol. Rev.*, 1976, 40 : 803-846.
  
- BROWN, D. F., SPAULDING, P. L., and TWEDT, R. M.  
Enteropathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in the ligated rabbit ileum.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1977, 33 : 10-14.
  
- BURKE, V., ROBINSON, J., BEAMAN, J., GRACEY, M., LESMANA, M., ROCKHILL, R., ECHEVERRIA, P. and JANDA, J. M.  
Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas* spp.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1983, 18 : 1196-1200.
  
- BURKE, V., COOPER, M., ROBINSON, J., GRACEY, M., LESMANA, M., ECHEVERRIA, P., and JANDA, M.  
Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1984, 19 : 39-43.
  
- CALIA, F. M., and JOHNSON, D. E.  
Bacteriemia in suckling rabbits after oral challenge with *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1975, 11 : 1222-1225.
  
- CARRUTHERS, M. M.  
Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* in HeLa cell cultures.  
*J. Infect. Dis.*, 1975, 132 : 555-560.
  
- CARRUTHERS, M. M.  
In vitro adherence of Kanagawa positive *Vibrio parahaemolyticus* to epithelial cells.  
*J. Infect. Dis.*, 1977, 136 : 588-592.
  
- CHAMPSAUR, H., ANDREMONT, A., MATHIEU, D., ROTTMAN, E., and AUZEPY, P.  
Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*.  
*J. Infect. Dis.*, 1982, 145 : 248-254.
  
- CHATELAIN, R., BERCOVIER, H., GUIYOULE, A., RICHARD, C. et MOLLARET, H. H.  
Intérêt du composé vibriostatique O/129 pour différencier les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus* de la famille des *Enterobacteriaceae*,  
*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1979, 130 A : 449-454.

- CHENEY, C. P., SCHAD, P. A., FORMAL, S. B., and BOEDEKER, E. C.  
Species specificity of in vitro *E. coli* adherence to host intestinal cell membranes, and its correlation with in vivo colonization and infectivity.  
*Infect. Immun.* 1980, 28 : 1019-1027.
  
- CHERWONOGRODZKY, J. W., and CLARK, A. G.  
Effect of pH on the production of the Kanagawa hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1981, 34 : 115-119.
  
- CLARRIDGE, J. E., and ZIGHELBOIM-DAUM, S.  
Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1985, 21 : 302-306.
  
- COLLIER, H. O. J., CAMPBELL, N. R., and FITZGERALD, M. E. H.  
Vibriostatic activity in certain series of pteridines.  
*Nature*, 1950, 165 : 1004-1005.
  
- COLWELL, R. R.  
Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* : numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species.  
*J. Bacteriol.*, 1970, 104 : 410-433.
  
- COLWELL, R. R., and AUSTIN, B.,  
Numerical taxonomy, chap. 21, in GERHARDT, P., MURRAY, R. G. E., COSTILOW, R.N., NESTER, E. W., WOOD, W. A., KRIEG, N. R., and PHILIPS, G. B.,  
(eds), Manual of methods for general bacteriology, American Society of Microbiology, 1981, Washington, D. C.
  
- COLWELL, R. R., SEIDLER, R. J., KAPER, J., JOSEPH, S. W., GARGES, S., LOCKMAN, H., MANEVAL, D., BRADFORD, H. B., ROBERTS, N., REMMERS, E., HUQ, I., and HUQ, A.  
Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O<sub>1</sub> in Maryland and Louisiana estuaries.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1981, 41 : 555-558.
  
- COLWELL, R. R.  
Vibrios in the environment, in COLWELL, R. R. (ed.), 1984, WILEY, J. and sons, New-York.
  
- CRAIG, J. P., YAMAMOTO, K., TAKEDA, Y. and MIWATANI, T.  
Production of cholera-like enterotoxin by a *Vibrio cholerae* non O<sub>1</sub> strain isolated from the environment.  
*Infect. Immun.*, 1981, 34 : 90-97.

- CUMBERBATCH, N., GURWITH, M. J., LANGSTON, C. SACK, R. B.,  
and BRUNTON, J. L.  
Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila* : relationship of  
toxigenic isolates to diarrheal disease.  
*Infect. Immun.*, 1979, 23 : 829-837.
  
- DAVIS, W. A., KANE, J. G., and GARAGUSI, V. F.  
Human *Aeromonas* infections : a review of the literature, and a case report  
of endocarditis.  
*Medicine*, 1978, 57 : 267-277.
  
- DAVIS, B. R., FANNING, G. R., MADDEN, J. M., STEIGERWALT, A. G.,  
BRADFORD, H. B., SMITH, H. L., and BRENNER, D. J.  
Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and  
designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1981, 14 : 631-639.
  
- DAVIS J. W. and SIZEMORE R. K.  
Nonselectivity of Rimler-Shotts medium for *Aeromonas hydrophila* in  
estuarine environments.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1981, 42, 544-545.
  
- DONTA, S.T., MOON, H. W., and WHIPP, S. C.  
Detection of heat labile *E. coli* enterotoxin with the use of adrenal cells  
in tissue culture.  
*Science*, 1974, 183 : 334-336.
  
- DOTEVALL, H., JONSON - STROMBERG, G., SANYAL, S., and HOLMGREN, J.  
Characterization of enterotoxin and soluble hemagglutinin from *Vibrio*  
*mimicus* : identity with *Vibrio cholerae* O<sub>1</sub> toxin and hemagglutinin.  
*FEMS Microbiol. Lett.* 1985, 27 : 17-22.
  
- DUPONT, M. J., JOUVENOT, M., COUETDIC, G., and MICHEL-BRIAND, Y.  
Development of plasmid-mediated resistance in *Vibrio cholerae* during  
treatment with trimethoprim-sulfametoxazole.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 1985, 27 : 280-281.
  
- DUPRAY, E., and CORMIER, M .  
Optimal enrichment time for isolation of *Vibrio parahaemolyticus*  
in seafoods.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1983, 46 : 1234-1235.
  
- FORMAL, S. B., HALE, T. L., and SANSONETTI, P. J.  
Invasive enteric pathogens.  
*Rev. Infect. Dis.*, 1983, 5 (suppl. 4) : 702-707.



- FRAIRE, A. E.  
*Aeromonas hydrophila* infection.  
*J. Amer. Med. Ass.*, 1978, 239 : 192.
  
- FUJINO, T., SAKAZAKI, R., and TAMURA, K.  
Designation of the type strain of *Vibrio parahaemolyticus*, and description of 200 strains of the species.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1974, 24 : 447-449.
  
- FURNISS, A. L., LEE, J. V., and DONOVAN, T. J.  
The Vibrios - Public Health Laboratory Service.  
*Monograph series 11*, 1978, London : H. M. S. O.
  
- GAUTHIER, M. J., et CLEMENT, R.  
Essais d'application de microméthodes à l'étude taxonomique de bactéries hétérotrophes marines.  
*Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 1978, 11, 1 : 35-53.
  
- GEMMEL, C. G.  
Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins.  
*J. Med. Microbiol.*, 1984, 17 : 217-235.
  
- GIANELLA, R. A.  
Suckling mouse model for detection of heat-stable *E. coli* enterotoxin : characteristics of the model.  
*Infect. Immun.*, 1976, 14 : 95-99.
  
- GLASS, R. I., HUQ, I., ALIM, A. R. M. A., and YUNUS, M.  
Emergence of multiply antibiotic resistant *Vibrio cholerae* in Bangladesh.  
*J. Infect. Dis.*, 1980, 142 : 939-942.
  
- GOLSTEIN, F. W., GERBAUD, G. R., DODIN, A., HAUTEFORT, B. ACAR, J. F., et COURVALIN, P.  
Résistance transposable au triméthoprimé et à O/129 chez *Vibrio cholerae* biotype El Tor.  
Colloque sur les gènes bactériens d'importance médicale.  
Société Française de Microbiologie, 5 déc. 1984, Paris, France.
  
- GRAEVENITZ, A. von.  
*Aeromonas* and *Plesiomonas*, p. 220-225, in LENNETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER Jr, W. J., and TRUANT, J. P. (eds).  
Manual of clinical microbiology, 1980, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
  
- GRINGAS, S. P., and HOWARD, L. V.  
Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* to human epithelial cell lines.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1980, 39 : 369-371.

- GUERINOT, M. L., WEST, P. A., LEE, J. V., and COLWELL, R. R.  
*Vibrio diazotrophicus* sp. nov., a marine nitrogen fixing bacterium.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1982, 32 : 350-357.
  
- GUERRANT, R. L., MOORE, R. A., KIRSHENFELD, P. M., SANDE, M. A.  
Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood.  
*N. Engl. J. Med.*, 1975, 293 : 567-573.
  
- GUERRY, P., and COLWELL, R. R.  
Isolation of cryptic plasmid desoxyribonucleic acid from Kanagawa positive strains of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1977, 16 : 328-334.
  
- HACKNEY, C. R., KLEEMAN, E. G., RAY, B., and SPECK, M. L.  
Adherence as a method for differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1980, 40 : 652-658.
  
- HADA, H.S., and SIZEMORE, R.K.  
Plasmids in marine *Vibrio* spp. : incidence and determination of potential functions using numerical taxonomic methods, p. 183-194,  
*in* COLWELL, R. R. (ed), *Vibriosis in the environment*, 1984, WILEY, J., and sons, New-York.
  
- HADA, H. S., WEST, P. A., LEE, J. V., STEMLER, J., and COLWELL, R. R.  
*Vibrio tubiashii*, sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1984, 34 : 1-4.
  
- HANSEN, J. B., and OLSEN, R. H.  
Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG<sub>1</sub> and pMG<sub>5</sub>.  
*J. Bacteriol.*, 1978, 135 : 227-238.
  
- HANSON, P. G., STANDRIDGE, J., JARRETT, F., and MAKI, D. G.  
Freshwater wound infection due to *Aeromonas hydrophila*.  
*J. Amer. Med. Ass.*, 1977, 238 : 1053-1054.
  
- HICKMAN, F. W., FARMER III, J. J., HOLLIS, D. G., FANNING, G. R., STEIGERWALT, A. G., WEAWER, R. E., and BRENNER, D. J.  
Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1982, 15 : 395-401.
  
- HONDA, T., GOSHIMA, K., TAKEDA, Y., SUGINO, Y. and MIWATANI, T.  
Demonstration of the cardiotoxicity of thermostable direct hemolysin (lethal toxin) produced by *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1976, 13 : 163-171.

- HONDA, T., CHEARSKUL, S., TAKEDA, Y., and MIWATANI, T.  
Immunological methods for detection of Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11 : 600-603.
  
- HONDA, T., ARITA, M., TAKEDA, T., YOH, M., and MIWATANI, T.  
Non - O<sub>1</sub> *Vibrio cholerae* produces two newly identified toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin and *E. coli* heat-stable enterotoxin.  
*Lancet*, 1985, ii : 163-164.
  
- HONDA, T., SATO, M., NISHIMURA, T., HIGASHITSUTSUMI, M., FUKAI, K., and MIWATANI, T.  
Demonstration of cholera toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay.  
*Infect. Immun.*, 1985, 50 : 322-323.
  
- HUGHES, J. M., BOYCE, J. M., ALEEM, A. R. M. A., WELLS, J. G., MIZANUR RAHMAN, A. S. M., and CURLIN, G. T.  
*Vibrio parahaemolyticus* enterocolitis in Bangladesh : report of an outbreak.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27 : 106-112.
  
- HUGHES, J. M., HOLUS, D. G., GANGAROSA, E. J., and WEAVER, R. E.,  
Non-cholera *Vibrio* infections in the United States : clinical, epidemiologic and laboratory features.  
*Ann. Internal Med.*, 1978, 88 : 602-606.
  
- HUQ, A., SMALL, E. B., WEST, P. A., HUQ, M. I., RAHMAN, R. and COLWELL, R. R.,  
Ecological relationships between *Vibrio cholerae* with planktonic crustacean copepods.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1983, 45 : 275-283.
  
- IIJIMA, Y., YAMADA, H., and SHINODA, S.  
Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* and its relation to pathogenicity.  
*Can. J. Microbiol.*, 1981, 27 : 1252-1259.
  
- JAMES, C., DIBLEY, M., BURKE, V., ROBINSON, J., and GRACEY, M.  
Immunological cross-reactivity of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* and cholera toxin.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 1982, 47 : 34-42.
  
- JOHNSON, D. E., WEINBERG, L., CIARKOWSKI, J., WEST, P., and COLWELL, R. R.  
Wound infection caused by Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus*.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1984, 20 : 811-812.

- JOSEPH, S. W., DAILY, O. P., HUNT, W. S., SEIDLER, R. J., ALLEN, D. A., and COLWELL, R. R.  
*Aeromonas* primary wound infection of a diver in polluted waters.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1979, 10 : 46-49.
  
- JOSEPH, S. W., COLWELL, R. R., and KAPER, J. B.  
*Vibrio parahaemolyticus* and related Vibrios.  
*CRC. Crit. Microbiol.*, 1982, 10 : 77-124.
  
- KALINA, G. P., ANTONOV, A. S., TUROVA, T. P., and GRAFOVA, T. I.  
*Allomonas enterica* gen. nov., sp. nov. ; deoxyribonucleic acid homology between *Allomonas* and some other members of the *Vibrionaceae*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1984, 34 : 150-154.
  
- KANEKO, T., and COLWELL, R. R.  
Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay.  
*J. Bacteriol.*, 1973, 113 : 24-32.
  
- KAPER, J. B., LOCKMAN, H., COLWELL, R. R., and JOSEPH, S. W.  
*Aeromonas hydrophila* : Ecology and toxigenicity of isolates from an estuary.  
*J. Appl. Bacteriol.*, 1981, 50 : 359-377.
  
- KAPER, J. B., CAMPEN, R. K., SEIDLER, R. J., BALDINI, M. M., and FALKOW, S.  
Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1984, 45 : 290-292.
  
- KARUNASAGAR, I.  
Production of hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* in a chemically defined medium.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1981, 41 : 1274-1275.
  
- KELLY, M. T.  
Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Beneckeia) vulnificus* occurrence in a gulf Coast environment.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1982, 44 : 820-824.
  
- KEUSH, G. T., and DONTA, S. T.  
Classification of enterotoxins on the basis of activity in cell cultures.  
*J. Infect. Dis.*, 1975, 131 : 58-63.

- KREGER, A., DE CHATELET, L., and SHIRLEY, P.  
Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes : association of virulence with resistance to phagocytosis.  
*J. Infect. Dis.*, 1981, 144 : 244-248.
  
- KREGER, A., and LOCKWOOD, D.  
Detection of extra-cellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*.  
*Infect. Immun.*, 1981, 33 : 583-590.
  
- KUSHNER, D. J., HAMAIDE, F., and MAC LEOD, R. A.  
Development of salt-resistant active transport in a moderately halophilic bacteria.  
*J. Bacteriol.*, 1983, 153 : 1163-1171.
  
- LAWSON, M. A., BURKE, V., and CHANG, B. J.  
Invasion of HEp - 2 cells by fecal isolates of *Aeromonas hydrophila*.  
*Infect. Immun.*, 1985, 47 : 680-683.
  
- LEE, J. V., COURT, P. A., DONOVAN, T. J., and FURNISS, A. L.  
The taxonomic significance of the MIC of the vibriostatic compound O/129 and other agents against *Vibrionaceae*.  
*J. Appl. Bacteriol.*, 1978, 45 : viii.
  
- LEE, J. V., DONOVAN, T. J., and FURNISS, A. L.  
Characterization, taxonomy and emended description of *Vibrio metschnikovii*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1978, 28 : 99-111.
  
- LEE, J. V., SHREAD, P., and FURNISS, A. L.  
Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F Vibrios, group EF 6).  
*J. Appl. Bacteriol.*, 1981, 50 : 73-94.
  
- LE RUDULIER, D., BERNARD, T., POCARD, J.-A., et GOAS, B.  
Accroissement de l'osmorégulation chez *Rhizobium meliloti* par la glycine-bétaïne et la proline-bétaïne.  
*C. R. Acad. Sci.(Paris)*, 1983, 297 : 155-160.
  
- LJUNGH, A., POPOFF, M., and WADSTROM, T.  
*Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease : detection of enterotoxin and biotyping of strains.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1977, 6 : 96-100.
  
- LJUNGH, A., WRETLIND, B., and MOLLBY, R.  
Separation and characterization of enterotoxin and two hemolysins from *Aeromonas hydrophila*.  
*Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B*, 1981, 89 : 387-397.

- LOCKWOOD, D. E., KREGER, A. S., and RICHARDSON, S. H.  
Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*.  
*Infect. Immun.*, 1982, 35 : 702-708.
  
- LOVE, M., TEEBKEN-FISHER, D., HOSE, J. E., FARMER, J. J., HICKMAN, F. W.,  
and FANNING, G. R.  
*Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish,  
*Chromis punctipinnis*.  
*Science*, 1981, 214 : 1139-1140.
  
- Mc DONELL, M. T., SINGLETON, F. L., and HOOD, M. A.  
Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and  
estuarine bacteria.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1982, 44 : 423-427.
  
- Mc NICOL, L. A., AZIZ, K. M. S., HUQ, I., KAPER, J. B., LOCKMAN, H. A.,  
REMMERS, E. F., SPIRA, W. M., VOLL, M. J., and COLWELL, R. R.  
Isolation of drug-resistant *Aeromonas hydrophila* from aquatic  
environments.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, 17 : 477-483.
  
- MA-LIN, C. F., and BEUCHAT, L. R.  
Recovery of chill-stressed *Vibrio parahaemolyticus* from oysters with  
enrichment broths supplemented with magnesium and iron salts.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1980, 39 : 179-185.
  
- MATSUSHITA, S., KUDOH, Y., and OHASHI, M.  
Transferable resistance to the vibriostatic agent 2,4 - diamino -  
6,7 diisopropyl - pteridine (O/129) in *Vibrio cholerae*.  
*Microbiol. Immunol.*, 1984, 28 : 1159-1162.
  
- MAUGERI, T. L., CRISAFI, E., GENOVESE, L., and SCOGLIO, M. E.  
Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20E system.  
*Microbiologica* , 1983, 1 : 73-79.
  
- MERKEL, J. R.  
Influence of salts on the vibriostatic action of 2,4-diamino-6,7  
diisopropyl ptéridine,  
*Arch. Mikrobiol.*, 1972, 81 : 379-382.
  
- MERRELL, B. R., WALKER, R. I., and JOSEPH, S. W.  
In vitro and in vivo pathologic effects of *Vibrio parahaemolyticus* on  
human epithelial cells.  
*Can. J. Microbiol.*, 1984, 30 : 381-388.

- MORGAN, D. R., JOHNSON, P. C., DUPONT, H. L., SATTERWHITE, T. K., and WOOD, L. V.  
Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans.  
*Infect. Immun.*, 1985, 50 : 62-65.
  
- MORRIS, Jr, J. G., WILSON, R., HOLLIS, D. G., WEAVER, R. E., MILLER, H. G., TACKET, C. O., HICKMAN, F. W. and BLAKE, P. A.  
Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*.  
*Lancet*, 1982, i : 1294-1297.
  
- NAKANISHI, H., IIDA, Y., MAESHIMA, K., TERAMOTO, T., HOSAKA, Y., and OZAKI, M.  
Isolation and properties of bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Biken J.*, 1966, 9 : 149-157.
  
- OLIVER, J. D., WARNER, R. A., and CLELAND, D. R.  
Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose fermenting Vibrios in the marine environment.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1983, 45 : 985-998.
  
- O. M. S.  
Choléra et autres diarrhées associées à des vibrions.  
*Bull. O. M. S.*, 1981, 59 : 27-52.
  
- PACHA, R. E., and KIEHN, E. D.  
Characterization and relatedness of marine Vibrios pathogenic to fish : physiology, serology and epidemiology.  
*J. Bacteriol.*, 1969, 100 : 1242-1247.
  
- PICARD, B., ARLET, G., et GOULLET, P.  
Septicémies à *Aeromonas hydrophila*. Aspects épidémiologiques. Quinze observations.  
*Presse Méd.*, 1984, 13 : 1203-1205.
  
- PIERCE, N. F., KAPER, J. B., MEKALANOS, J. J., and CRAY, W. C., Jr.  
Role of cholera toxin in enteric colonization by *Vibrio cholerae* O<sub>1</sub> in rabbits.  
*Infect. Immun.*, 1985, 50 : 813-816.

- PITARANGSI, C., ECHEVERRIA, P., WHITMIRE, R., TIRAPAT, C., FORMAL, S., DAMMIN, G. J., and TINGTALAPONG, M.  
Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* : prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand.  
*Infect. Immun.*, 1982, 35 : 666-673.
  
- POPOFF, M. and VERON, M.  
A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila* - *Aeromonas punctata* group.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1976, 94 : 11-22.
  
- QADRI, S. M. H., GORDON, L. P., WENDE, R. D. and WILLIAMS, R. P.  
Meningitis due to *Aeromonas hydrophila*.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1976, 3 : 102-104.
  
- RAMSAY, A. M., ROSENBAUM, B. J., YARBROUGH, C. L., and HOTZ, J. A.  
*Aeromonas hydrophila* sepsis in a patient undergoing hemodialysis therapy.  
*J. Amer. Med. Ass.*, 1978, 239 : 128-129.
  
- REICHEL, J. L. and BAUMANN, P.  
Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria.  
*Arch. Microbiol.*, 1974, 97 : 329-345.
  
- REYES, A. L., CRAWFORD, R. G., SPAULDING, P. L., PEELER, J. T., and TWEDT, R. M.  
Hemagglutination and adhesiveness of epidemiologically distinct strains of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1983, 39 : 721-725.
  
- RICHARD, C., LHUILLIER, M., et LAURENT, B.  
*Plesiomonas shigelloides* : une Vibrionacée entéropathogène exotique.  
*Bull. Inst. Pasteur*, 1978, 76 : 187-200.
  
- ROBINS-BROWNE, R. M., STILL, C. S., ISAACSON, M., KOORNHOF, H. J., APPELBAUM, P. C., and SCRAGG, J. N.  
Pathogenic mechanisms of a non-agglutinable *Vibrio cholerae* strain : demonstration of invasive and enterotoxigenic properties.  
*Infect. Immun.*, 1977, 18 : 542-545.
  
- ROCHE, M. C., FAVAREL-GARRIGUES, J. C., LENG, B., et LATRILLE, J.  
Septicémie post-abortum à *Aeromonas hydrophila*.  
*Méd. Mal. Infect.*, 1980, 10 : 311-313.
  
- ROSENTHAL, S. L.  
A simplified method for single carbon source tests with *Pseudomonas* species.  
*J. Appl. Bacteriol.*, 1974, 37 : 437-441.



- ROUF, M. A., and RIGNEY, M. M.  
Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*.  
*Appl. Microbiol.*, 1971, 22 : 503-506.
- SACK, D. A., and SACK, R. B.  
Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y<sub>1</sub> adrenal cells in miniculture.  
*Infect. Immun.*, 1975, 11 : 334-336.
- SACK, D. A., HUDA, S., NEOGI, P. K. B., DANIEL, R. R. and SPIRA, W. M.  
Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and anti-toxin.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11 : 35-40.
- SAHA, M. R., SEN, D., DE, S. P., SIRCAR, B. K., SENGUPTA, P. G., DEB, B. C., and PAL, S. C.  
Kanagawa phenomenon and serotypic pattern of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from various sources in Calcutta.  
*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1982, 76 : 786-789.
- SAKAZAKI, R.  
Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 1968, 21 : 359-362.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K., KATO, T., OBARA, Y., YAMAI, S., and HOB0, K.  
Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* - III - Enteropathogenicity.  
*Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 1968, 21 : 325-331.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K., NAKAMURA, A., KURATA, T., GOHDA, A., and KAZUNO, Y.  
Studies on enteropathogenic activity of *Vibrio parahaemolyticus* using ligated gut loop model in rabbits.  
*Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 1974, 27 : 35-43.
- SAKURAI, J., HONDA, T., JINGUJI, Y., ARITA, M., and MIWATANI, T.  
Cytotoxic effect of the thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* on FL cells.  
*Infect. Immun.*, 1976, 13 : 876-883.
- SANSONETTI, P., KOPECKO, D. J., and FORMAL, S. B.  
*Shigella sonnei* plasmids : evidence that a large plasmid is necessary for virulence.  
*Infect. Immun.*, 1981, 34 : 75-83.

- SCHIEWE, M. H., TRUST, T. J., and CROSA, J. H.  
*Vibrio ordalii* sp. nov. : a causative agent of vibriosis in fish.  
*Curr. Microbiol.*, 1981, 6 : 343-348.
  
- SCHMIDT, V., CHMEL, H., and COBBS, C.  
*Vibrio alginolyticus* infections in humans.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1979, 10 : 666-668.
  
- SEIDLER, R. J., ALLEN, D. A., COLWELL, R. R., JOSEPH, S. W., and DAILY, O. P.  
Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1980, 40 : 715-720.
  
- SEIDLER, R. J., and EVANS, T. M.  
Computer assisted analysis of *Vibrio* field data : four coastal areas, p. 411-425. in COLWELL, R. R. (ed),  
*Vibrios in the environment*, 1984, WILEY, J., and sons, New-York.
  
- SERENY, B.  
Experimental *Shigella* keratocconjunctivitis : a preliminary report.  
*Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1955, 2 : 293-296.
  
- SHEWAN, J. M., HODGKISS, W., and LISTON, J.  
A method for the rapid differentiation of certain non-pathogenic, asporogenous bacilli.  
*Nature*, 1954, 173 : 208-209.
  
- SHIROUZU, K., MIYAMOTO, Y., YASAKA, T., MATSUBAYASHI, Y. and MORIMATSU, M.  
*Vibrio vulnificus* septicemia.  
*Acta Pathol. Jpn.*, 1985, 35 : 731-739.
  
- SOCHARD, M. R., WILSON, D. F., AUSTIN, B., and COLWELL, R. R.  
Bacteria associated with the surface and the gut of marine copepods.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1979, 37 : 750-759.
  
- SPIRA, W. M.  
Tactics for detecting pathogenic vibrios in the environment, p. 251-268,  
in COLWELL, R. R. (ed).  
*Vibrios in the environment*, 1984, WILEY, J., and sons, New-York.
  
- SPIRA, W. M., and FEDORKA-CRAY, P. J.  
Production of cholera toxin-like toxin by *Vibrio mimicus* and non-0<sub>1</sub> *Vibrio cholerae* : batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants.  
*Infect. Immun.*, 1983, 42 : 501-509.

- SPIRA, W. M., and FEDORKA-CRAY, P. J.  
Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin.  
*Infect. Immun.*, 1984, 45 : 679-684.
  
- STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J., and DOUDOROFF, M.  
The aerobic pseudomonads : a taxonomic study.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1966, 43 : 159-271.
  
- STEVENSON, I. L.  
Utilisation of aromatic hydrocarbons by *Arthrobacter* spp.  
*Can. J. Microbiol.*, 1967, 13 : 205-211.
  
- SUNDARAM, S., and MURTHY, K. V.  
Occurrence of 2,4 - diamino - 6,7 - diisopropyl - pteridine (0/129) resistance in human isolates of *Vibrio cholerae*.  
*FEMS Microbiol. Letters*, 1983, 19 : 115-117.
  
- TANIGUCHI, H., SATO, K., OGAWA, M., UDOU, T., and MIZUGUCHI, Y.  
Isolation and characterization of a filamentous phage, Vf 33, specific for *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Microbiol. Immunol.*, 1984, 28 : 327-337.
  
- THOMSON, J. A., HENDSON, M., and MAGNES, R. M.  
Mutagenesis by insertion of drug-resistance transposon Tn 7 into a *Vibrio* species.  
*J. Bacteriol.*, 1981, 148 : 374-378.
  
- TISON, D. L., NISHIBUCHI, M., GREENWOOD, J. D., and SEIDLER, R. J.  
*Vibrio vulnificus* biogroup 2 : new biogroup pathogenic for eels.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1982, 44 : 640-646.
  
- TISON, D. L., and SEIDLER, R. J.  
*Vibrio aestuarianus*, a new species from estuarine waters and shellfish.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, 33 : 699-702.
  
- TSUKAMOTO, T., KINOSHITA, Y., SHIMADA, T., and SAKAZAKI, R.  
Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*.  
*J. Hyg., Camb.*, 1978, 80 : 275-280.
  
- TURNBULL, P. C. B., LEE, J. V., MILIOTIS, M. D., VAN DE WALLE, S., KOORNHOF, H. J., JEFFERY, L., and BRYANT, T. N.  
Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolates of *Aeromonas* species.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1984, 19 : 175-180.

- TWEDT, R. M., BROWN, D. F., and ZINK, D. L.  
Comparison of plasmid deoxyribonucleic acid contents, culture characteristics, and indices of pathogenicity among selected strains of *Vibrio parahaemolyticus*.  
*Infect. Immun.*, 1981, 33 : 322-325.
  
- VERON, M.  
La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables.  
*C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1965, 261 : 5243-5246.
  
- VERON, M.  
Sur un critère de calcul du meilleur niveau de coupure d'un dendogramme de classification hiérarchique.  
*Ann. Microbiol., Inst. Pasteur* 1974, 125B : 29-44.
  
- VERON, M.  
Nutrition et taxonomie des *Enterobacteriaceae* et bactéries voisines - I -  
Méthode d'étude des auxanogrammes.  
*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1975, 126A : 267-274.
  
- VERON, M., et LE MINOR, L.  
Nutrition et taxonomie des *Enterobacteriaceae* et bactéries voisines - III  
Caractères nutritionnels et différenciation des groupes taxonomiques.  
*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1975, 126B : 125-147.
  
- VERON, M.  
Croissance et nutrition bactériennes, chap. 2 dans LE MINOR, L., et  
VERON, M.  
Bactériologie médicale, 1982, Flammarion Médecine - Sciences, Paris.
  
- VERON, M.  
Taxonomie bactérienne, chap. 6, dans LE MINOR, L. et VERON, M.  
Bactériologie médicale, 1982, Flammarion Médecine - Sciences, Paris.
  
- WALL, V. W., KREGER, A. S., and RICHARDSON, S. H.  
Production and partial characterization of a *Vibrio fluvialis* cytotoxin.  
*Infect. Immun.*, 1984, 46 : 773-777.
  
- WATKINS, W. D., and CABELLI, V. J.  
Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an  
estuarine environment.  
*Appl. Environm. Microbiol.*, 1985, 49 : 1307-1313.

- WATSON, I. M., ROBINSON, J. O., BURKE, V., and GRACEY, M.  
Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors and clinical features.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1985, 22 : 48-51.
  
- WEST, P. A., and COLWELL, R. R.  
Identification and classification of *Vibrionaceae* : an overview, p. 285-363, *in* R. R. COLWELL (Ed.).  
*Vibrios in the environment*, WILEY, J., and sons, 1984, New-York.
  
- YANG, Y., YEH, L., CAO, Y., BAUMANN, L., BAUMANN, P., TANG, J. S., and BEAMAN, B.  
Characterization of marine luminous bacteria isolated off the coast of China and description of *Vibrio orientalis*, sp. nov.  
*Curr. Microbiol.*, 1983, 8 : 95-100.
  
- YOLKEN, R. H., GREENBERG, H. B., MERSON, M. M., SACK, R. B., and KAPIKIAN, A. Z.  
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *E. coli* heat - labile enterotoxin.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1977, 6 : 439-444.

**ANNEXE 1**

Tableau I.A : caractères biochimiques (galeries API 20 E)  
des souches étudiées.

N°	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	URE	IND	VP	GEL	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2	N2
1	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
3	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
6	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
7	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
8	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
9	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
10	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
11	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
12	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
13	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
14	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
16	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
17	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
18	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
19	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
20	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
21	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
22	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
23	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
24	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
25	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
26	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
27	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
28	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
29	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
30	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
31	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
32	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
33	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
34	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
35	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
36	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
37	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
38	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
39	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
40	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
41	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
42	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
43	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
44	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
45	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
46	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-

N°	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	URE	IND	VP	GEL	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2	N2
47	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
49	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
50	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
51	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
52	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
53	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
54	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
55	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
56	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
57	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
58	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
59	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
60	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
61	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
62	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
63	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
64	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
65	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
66	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
67	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
68	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
69	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
70	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
71	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
72	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
73	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
74	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
75	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
76	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
77	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
78	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
79	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
80	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
81	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
82	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
83	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
84	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
85	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
86	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
87	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
88	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
89	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
90	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
91	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
92	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
93	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
94	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
95	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
96	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-



N°	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	URE	IND	VP	GEL	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
97	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
98	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
99	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
100	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
101	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
102	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
103	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
104	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
105	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
106	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
107	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
108	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
109	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
110	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
111	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
112	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
113	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
115	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
116	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
117	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
118	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
119	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
120	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
121	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
122	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
123	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
124	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
125	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
126	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
127	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
128	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
129	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-

NOTA : ne sont pas mentionnés dans le tableau les caractères suivants :

- |                                 |   |                           |
|---------------------------------|---|---------------------------|
| - production d'H <sub>2</sub> S | } | - pour toutes les souches |
| - TDA                           |   |                           |
| - fermentation du glucose       | } | + pour toutes les souches |
| - fermentation du mannitol      |   |                           |

Tableau II.A : Etude de la croissance à 4 et 42°C.

N°	4° C	42° C	N°	4° C	42° C	N°	4° C	42° C
1	-	+	54	+	+	106	-	+
2	-	+	55	+	-	107	-	-
3	-	+	56	-	+	108	+	+
4	-	+	57	+	-	109	+	+
5	-	+	58	+	-	110	-	-
6	-	+	59	-	+	111	-	+
7	-	+	60	-	+	112	-	+
8	-	+	61	-	+	113	-	-
9	-	+	62	-	+	115	-	-
10	-	+	63	-	+	116	-	-
11	-	+	64	-	+	117	-	-
12	-	+	65	-	+	118	+	-
13	-	+	66	-	+	119	+	+
14	-	+	67	-	+	120	-	+
15	-	+	68	-	+	121	-	+
16	-	+	69	-	+	122	+	-
17	-	+	70	-	-	123	-	-
18	-	+	71	-	+	124	-	-
19	-	+	72	-	+	125	+	-
20	-	+	73	-	+	126	-	+
21	-	+	74	-	+	127	+	-
22	-	+	75	-	+	128	+	+
23	-	+	76	-	-	129	-	+
24	-	+	77	+	-			
25	-	+	78	+	-			
26	-	-	79	+	+			
27	-	+	80	-	-			
28	-	+	81	-	+			
29	-	+	82	-	-			
30	-	+	83	+	-			
31	-	+	84	-	-			
32	-	+	85	+	-			
33	-	+	86	-	-			
34	-	+	87	-	-			
35	-	+	88	+	+			
36	-	+	89	+	+			
37	-	+	90	-	-			
38	+	+	91	+	-			
39	-	-	92	-	-			
40	-	+	93	-	-			
41	+	-	94	+	+			
42	+	+	95	-	+			
43	+	-	96	-	-			
44	-	-	97	-	+			
45	-	-	98	-	+			
46	+	+	99	-	+			
47	+	-	100	-	+			
49	+	-	101	-	-			
50	+	-	102	-	+			
51	+	-	103	-	-			
52	+	-	104	-	+			
53	+	-	105	-	+			

NOTA : toutes les souches cultivent à 25 et 37° C.

Tableau III.A : Etude de la sensibilité au composé vibriostatique  
 O/129 : diamètres des zones d'inhibition obtenues par la méthode des disques, et CMI en milieux liquide et solide.

N°	Disques IPP (mm)	Comprimés Rosco (mm)	CMI Liquide (µg/ml)	CMI Solide (µg/ml)
1	23	24	30	120
2	11	22	30	120
3	15	25	15	60
4	NT	43	7,5	10
5	17	23	15	120
6	19	22	30	120
7	15	22	30	240
8	20	25	30	120
9	10	30	30	60
10	16	17	60	120
11	15	19	30	120
12	18	18	240	240
13	15	23	15	60
14	22	30	15	40
15	11	22	30	120
16	17	28	15	60
17	15,5	22	15	60
18	19,5	30	15	60
19	19,5	30	7,5	60
20	23	17	30	240
21	16	22	15	120
22	19	22	30	120
23	12	18	60	60
24	17	22	60	60
25	22	16	30	120
26	15	16	30	640
27	17	17	30	640
28	25	24	15	40
29	14,5	16	30	240
30	13	15	60	120
31	18	22	30	60
32	22	25	7,5	40
33	20	26	15	40
34	13,5	17	30	120
35	18	23	30	120
36	27	19	60	40
37	16	21	60	240
38	0	0	> 480	640
39	0	0	> 480	> 640
40	0	0	480	640
41	0	0	480	> 640
42	0	0	480	640
43	0	0	240	640
44	0	0	480	480
45	0	0	480	640
46	0	0	480	640

N°	Disques IPP (mm)	Comprimés Rosco (mm)	CMI Liquide (µg/ml)	CMI Solide (µg/ml)
47	0	0	480	640
49	0	0	480	> 640
50	0	0	480	> 640
51	0	0	480	640
52	0	0	480	> 640
53	0	0	480	> 640
54	0	0	480	> 640
55	0	0	480	640
56	13	23	15	60
57	0	0	480	> 640
58	10	0	480	NT
59	16,5	23	30	40
60	15,5	24	30	40
61	21	28	15	60
62	16	27	30	120
63	17	27	30	40
64	17	30	30	60
65	18	25	30	240
66	21	27	480	120
67	17,5	23	7,5	120
68	17	23	15	120
69	17,5	23	15	60
70	15,5	27	NT	NT
71	15	26	3,75	120
72	22	22	30	40
73	17,5	25	30	120
74	18	29	7,5	120
75	15	24	15	240
76	0	0	480	> 640
77	0	0	480	> 640
78	0	0	480	> 640
79	0	0	480	> 640
80	0	0	480	240
81	20	23	15	240
82	0	0	480	> 640
83	0	0	480	> 640
84	0	0	480	240
85	0	0	> 480	> 640
86	0	0	480	> 640
87	0	0	480	240
88	0	0	480	480
89	0	0	480	> 640
90	0	0	480	> 640
91	0	0	480	> 640
92	0	0	480	> 640

N°	Disques IPP (mm)	Comprimés Rosco (mm)	CMI Liquide (µg/ml)	CMI Solide (µg/ml)
93	0	0	> 480	> 640
94	0	0	480	> 640
95	0	0	> 480	640
96	0	0	> 480	240
97	14	25	15	240
98	14	20	15	240
99	NT	20	15	240
100	17	22	120	240
101	22	30	60	240
102	18	21	15	60
103	0	0	480	> 640
104	13,5	21	7,5	60
105	12,5	23	15	120
106	14	22	15	120
107	19	24	7,5	120
108	19	19	15	120
109	14,5	20	30	120
110	0	0	480	> 640
111	13	13	30	240
112	23	22	7,5	120
113	25	27	7,5	60
115	28	27	3,75	60
116	29	28	3,75	60
117	29	27	3,75	60
118	0	0	> 480	NT
119	0	0	480	NT
120	NT	35	NT	NT
121	"	30	"	"
122	"	33	"	"
123	"	35	"	"
124	"	20	"	"
125	"	27	"	"
126	"	20	"	"
127	"	27	"	"
128	"	0	"	"
129	"	25	"	"

NT : non testé

Tableau IV.A : Croissance à différentes concentrations de NaCl,  
en milieu liquide et solide.

N°	MILIEU LIQUIDE % NaCl									MILIEU SOLIDE % NaCl								
	0	0,5	1	3	5	7	8	10	12	0	0,5	1	3	5	7	8	10	12
1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
5	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
6	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
8	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
9	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
10	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
11	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
13	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
14	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
15	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
16	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
17	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
18	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
19	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
20	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
22	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
23	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
24	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
25	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
26	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
27	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
28	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
29	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
30	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
31	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
32	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
33	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
34	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
35	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
36	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
37	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
38	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
39	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
41	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
42	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
45	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
46	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-



N°	MILIEU LIQUIDE									MILIEU SOLIDE								
	% NaCl									% NaCl								
	0	0,5	1	3	5	7	8	10	12	0	0,5	1	3	5	7	8	10	12
98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
100	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
101	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
102	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
103	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
104	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
105	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
106	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
107	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
108	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
109	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
110	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
111	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
112	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
113	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
115	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
116	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
117	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
118	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-							
119	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-							
120	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-							
121	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-							
122	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-							
123	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-							
124	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-							
125	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-							
126	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-							
127	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-							
128	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-							
129	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-							

NT : non testé



Tableau V.A : utilisation de substrats comme seule source de carbone et d'énergie.

N°	Alanine	Arabinose	Aspartate	Fumarate	Glutamate	Histidine	α-kétoglutarate	Lactate	Mannose	Proline	Pyruvate	Sérine	Succinate	Tréhalose
1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
6	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
15	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
17	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
19	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
20	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
21	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
23	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
25	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
27	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
29	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
31	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
32	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
34	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
35	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
36	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
39	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+

N°	Alanine	Arabinose	Aspartate	Fumarate	Glutamate	Histidine	αkétoglutarate	Lactate	Mannose	Proline	Pyruvate	Sérine	Succinate	Tréhalose
40	+	+		+	+				+		+		+	+
41				+	+				+		+		+	
42	+			+	+				+		+		+	
43		+		+	+				+		+		+	
44	+	+			+				+		+		+	
45		+		+	+				+		+		+	
46	+	+		+	+				+		+		+	
47	+	+		+	+				+		+		+	
49		+		+	+				+		+		+	
50		+		+	+				+		+		+	
51				+	+				+		+		+	
52		+		+	+				+		+		+	
53		+		+	+				+		+		+	
54	+	+		+	+				+		+		+	
55		+		+	+				+		+		+	
56	+			+	+				+		+		+	
57	+	+		+	+				+		+		+	
58		+		+	+				+		+		+	
59	+	+		+	+				+		+		+	
60	+	+		+	+				+		+		+	
61	+	+		+	+				+		+		+	
62	+	+		+	+				+		+		+	
63	+	+		+	+				+		+		+	
64	+	+		+	+				+		+		+	
65	+	+		+	+				+		+		+	
66	+	+		+	+				+		+		+	
67	+	+		+	+				+		+		+	
68	+	+		+	+				+		+		+	
69	+	+		+	+				+		+		+	
70	+	+		+	+				+		+		+	
71	+	+		+	+				+		+		+	
72	+	+		+	+				+		+		+	
73	+	+		+	+				+		+		+	
74	+	+		+	+				+		+		+	
75	+	+		+	+				+		+		+	
76	+	+		+	+				+		+		+	
77		+		+	+				+		+		+	
78		+		+	+				+		+		+	
79		+		+	+				+		+		+	
80		+		+	+				+		+		+	
81		+		+	+				+		+		+	
82		+		+	+				+		+		+	
83		+		+	+				+		+		+	
84		+		+	+				+		+		+	

N°	Alanine	Arabinose	Aspartate	Fumarate	Glutamate	Histidine	Okétoglutarate	Lactate	Mannose	Proline	Pyruvate	Sérine	Succinate	Tréhalose
85	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
86	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
87	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
88	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
89	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
90	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
91	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
92	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
93	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
94	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
95	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
96	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
97	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
101	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
108	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
109	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
110	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
115	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
117	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
118	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
119	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
121	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
122	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
123	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
124	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
127	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
128	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
129	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

NOTA : toutes les souches utilisent le gluconate, mais aucune n'utilise le proprionate.

**ANNEXE 2**

Formule des milieux de culture utilisés ou cités

1) B.H.I. : Brain Heart Infusion (D.I.F.C.O.) :

- infusion de cervelle de veau	200 g
- infusion de coeur de boeuf	250 g
- protéose peptone	10 g
- bacto-dextrose	2 g
- NaCl	5 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
- eau distillée	1000 ml

pH 7,4

2) Milieu de Chapman (BIO-MERIEUX)

- extrait de viande de boeuf	1 g
- bio-Polytone	10
- NaCl	75
- D-mannitol	10
- gélose	15
- rouge de phénol	0,025
- eau distillée	1000 ml

pH 7,4

3) Milieu de Cowes et Hayes, modifié par Lee et coll. (1981)

- NH <sub>4</sub> Cl	5 g
- NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
- Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
- K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	3

- K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
- Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,1
- Na Cl	10
- Mg Cl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	4
- agar purifié (OXOID)	10
- eau distillée	1000 ml

#### 4) Milieu C.M. 55 (OXOID)

- extrait viande de boeuf	10 g
- peptone	10
- Na Cl	5
- gélose	15
- eau distillée pH 7,3	1000 ml

#### 5) Milieu de Drigalski (Inst. Pasteur Production)

- peptone	15 g
- extrait de viande	3
- extrait de levure	3
- désoxycholate de sodium	1
- thiosulfate de sodium	1
- lactose	15
- cristal violet	0,005
- bleu de bromothymol	0,08
- agar	11
- eau distillée pH 7,4	1000 ml

#### 6) Milieu de Drigalski "salé"

Idem 5. Utiliser de l'eau de mer à la place de l'eau distillée.

7) Eau peptonée

- bio-trypcase (BIO-MERIEUX) 10 g
  - eau distillée 1000 ml
- pH 7.

8) Gélose peptonée

- bio-trypcase 10 g
  - agar purifié 15
  - eau distillée 1000 ml
- pH 7

9) G.S.T.B. : bouillon glucosé, salé, au teepol

- peptone 10 g
  - extrait de viande de boeuf 3
  - Na Cl 30
  - glucose 5
  - violet de méthyle 0,002
  - teepol 4
  - eau distillée 1000 ml
- pH 8,6

10) H.I.A. : heart infusion agar (D.I.F.C.O.)

- infusion de viande de boeuf d'un poids de 500 g
  - bacto-tryptose 10
  - Na Cl 5
  - bacto-agar 15
  - eau distillée 1000 ml
- pH 7,4

10 a) Milieu minimum M 63

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	13,6 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
- $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
- $\text{Fe SO}_4$	0,0005
- glucose	1,8
- eau distillée	1000 ml
pH 7	

11) Milieu de Mueller-Hinton (Inst. Pasteur Production)

- macération de viande de boeuf	300 ml
- hydrolysate de caséine	17,5 g
- amidon	1,5
- agar	10
- eau distillée	1000 ml
pH 7,4	

12) Milieu T.C.B.S. : thiosulfate-citrate-bile-saccharose (D.I.F.C.O.)

- extrait de levure	5 g
- protéose-peptone	10
- citrate de Na	10
- thiosulfate de Na	10
- citrate de fer	1
- bile de boeuf	8
- saccharose	20
- Na Cl	10
- bleu de bromothymol	0,04
- bleu de thymol	0,04
- agar	15
- eau distillée	1000 ml
pH 8,6	



13) Gélose trypticase-soja (BIO-MERIEUX)

- bio-trypcase	15 g
- bio-soyase	5
- Na Cl	5
- gélose	15
- eau distillée	1000 ml

pH 7,3

14) Gélose trypticase-soja "salée"

Idem 13. Utiliser de l'eau de mer à la place de l'eau distillée.

15) Gélose de Wagatsuma

- bacto-extrait de levure	3 g
- bacto-peptone	10
- Na Cl	70
- $K_2 HPO_4$	5
- mannitol	10
- cristal violet	0,0001
- bacto-agar	15
- eau distillée	1000 ml

pH 8

Ajouter au moment de couler les boîtes, 50 ml de sang humain ou de lapin, défibriné.

**ANNEXE 3**

**Tableau I C :** Caractères différentiels des espèces et biovars du genre Vibrio (d'après le Bergey's Manual, 1984)

Characteristics	1. <i>V. cholerae</i>	2. <i>V. metschnikovii</i>	3. <i>V. harveyi</i>	4. <i>V. campbellii</i>	5. <i>V. parahaemolyticus</i>	6. <i>V. alginolyticus</i>	7. <i>V. natrigens</i>	8. <i>V. vulnificus</i>	9. <i>V. nereis</i>	10. <i>V. fluviatilis</i> I	10. <i>V. fluviatilis</i> II	11. <i>V. splendidus</i> I	11. <i>V. splendidus</i> II	12. <i>V. pelagius</i> I	12. <i>V. pelagius</i> II	13. <i>V. nigripunclritudo</i>	14. <i>V. anguillarum</i> I	14. <i>V. anguillarum</i> II	15. <i>V. fischeri</i>	16. <i>V. logei</i>	17. <i>V. proteolyticus</i>	18. <i>V. gazogenes</i>	19. <i>V. marinus</i>	20. <i>V. costicola</i>	
Number of strains tested	161	6	91	44	134	38	8	15	6	15	7	4	15	7	4	14	20	5	12	11	1	1	1	2	
Flagellation:																									
3-12 Polar flagella	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Lateral flagella when grown on solid media	-	-	+	+	+	+	-	-	-	d	d	-	d	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Swarming on solid complex media	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Straight rods <sup>b</sup>	d	d	+	+	+	+	+	-	+	d	-	-	d	+	-	+	-	d	+	+	+	-	+	-	-
PHB-accumulation	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	d	-	-	-	-	d	-	d	-	+	+	-	+	-	-
Pigmentation:																									
Yellow-orange	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Blue-black	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> to NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d
Luminescence	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Gas from D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Production of acetoin and/or diacetyl	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Na <sup>+</sup> required for growth	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Requirement for organic growth factors	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d	-	-	+	d	-
Growth at:																									
4°C	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-	d	-	d	d	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	d	-	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	d	-	+	+	+	+	d	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Production of:																									
Amylase	+	+	+	+	+	+	d	+	-	+	d	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	d	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Alginase	-	-	d	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-
Chitinase	+	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	d	d	+	+	+	+	+	-
Utilization of:																									
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabinose	-	-	d	-	d	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
D-Mannose	d	d	+	d	+	d	d	+	+	+	d	+	-	d	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-
D-Galactose	+	d	d	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	-
Sucrose	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	d	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	-	+	+
Cellobiose	-	-	+	d	-	-	d	+	-	d	d	+	d	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Lactose	-	d	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	d	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	d	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-
D-Gluconate	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	d	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronate	-	-	+	-	d	-	d	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galacturonate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Traits useful for the preliminary identification of species (see text) are designated by boldface type. For symbols see standard definitions (except for footnote b below).

<sup>b</sup> +, straight rods; -, curved rods.

<sup>c</sup> Straight rods in exponential phase of growth becoming curved in stationary phase.

<sup>d</sup> Determined by the anaerobic production of ornithine from arginine. See text for a discussion of problems associated with the Thornley method which measures alkali production from arginine.

<sup>e</sup> Luminous strains of this species have been found by Desmarchelier and Reichelt (1981) and West (1980, Ph.D. thesis).

<sup>f</sup> Wild-type strains are unable to utilize lactose; many strains may readily acquire this property by mutation.

Characteristics	1. <i>V. cholerae</i>	2. <i>V. metschnikovii</i>	3. <i>V. harveyi</i>	4. <i>V. campbellii</i>	5. <i>V. parahemolyticus</i>	6. <i>V. alginolyticus</i>	7. <i>V. natriegens</i>	8. <i>V. vulnificus</i>	9. <i>V. nereis</i>	10. <i>V. fluvialis</i> †	10. <i>V. fluvialis</i> ‡	11. <i>V. splendidus</i> †	11. <i>V. splendidus</i> ‡	12. <i>V. pelagius</i> †	12. <i>V. pelagius</i> ‡	13. <i>V. nigriripulchritudo</i>	14. <i>V. anguillarum</i> †	14. <i>V. anguillarum</i> ‡	15. <i>V. fischeri</i>	16. <i>V. fujiei</i>	17. <i>V. proteolyticus</i>	18. <i>V. gazogenes</i>	19. <i>V. marinus</i>	20. <i>V. costicola</i>
Propionate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valerate	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Heptanoate	-	d	+	-	+	+	+	-	d	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Glutarate	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Malate	+	+	d	d	+	+	+	d	+	+	+	+	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
β-Hydroxybutyrate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	d	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DL-Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	d	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	-
α-Ketoglutarate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	d	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
meso-Inositol	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-	-	-	
Ethanol	-	-	-	-	+	d	+	-	+	+	+	-	-	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-α-Alanine	-	+	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	d	-	-	-	+	+	+	+
D-α-Alanine	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Alanine	-	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-Serine	d	+	+	d	+	+	+	-	d	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
L-Leucine	-	-	-	-	+	+	d	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Glutamate	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
γ-Aminobutyrate	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-Aminovalerate	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	d	d	d	-	+	+	+	d	d	+	d	d	d	d	d	+	+	d	-	-	+	-	-	+
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Tyrosine	-	-	+	d	+	+	d	+	d	+	+	d	d	d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Putrescine	-	-	-	-	+	d	+	-	+	d	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Rhamnose, malonate, benzoate, spermine, betaine, sarcosine, hippurate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Traits useful for the preliminary identification of species (see text) are designated by boldface type. For symbols see standard definitions (except for footnote b below).

<sup>b</sup> +, straight rods; -, curved rods.

<sup>c</sup> Straight rods in exponential phase of growth becoming curved in stationary phase.

<sup>d</sup> Determined by the anaerobic production of ornithine from arginine. See text for a discussion of problems associated with the Thornley method which measures alkali production from arginine.

<sup>e</sup> Luminous strains of this species have been found by Desmarchelier and Reichelt (1981) and West (1980, Ph.D. thesis).

<sup>f</sup> Wild-type strains are unable to utilize lactose; many strains may readily acquire this property by mutation.

Tableau II C: caractères des espèces de *Photobacterium*  
(d'après le Bergey's Manual, 1984).

Characteristics	1. <i>P. phosphoreum</i>	2. <i>P. leiognathi</i>	3. <i>P. angustum</i>
Reduction of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> to NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+	d
Growth at:			
20°C	+	+	+
30°C	d	+	+
40°C	-	-	-
Requirement for L-methionine	d	-	-
Production of:			
Chitinase	+	+	d
Amylase, alginase	-	-	-
2,3-Butanediol	d	-	-
Gas from D-glucose	+	-	-
Luminescence	+	+	-
Growth at 4°C	+	-	d <sup>b</sup>
Growth at 35°C	-	+	+
Production of:			
Gelatinase	-	-	d <sup>b</sup>
Lipase	-	+	d
Utilization of:			
D-Glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, N-acetylglucosamine, glycerol	+	+	+
D-Ribose, D-gluconate, DL-lactate, succinate, fumarate	d	+	+
L-Aspartate	d	+	d
L-α-Alanine, L-serine	d	d	+
DL-Glycerate, DL-malate, L-threonine, L-glutamate	d	d	-
D-Gluconate	d	-	-
Caprate	-	d	-
Sucrose, trehalose	-	-	d

\* The following compounds cannot be utilized as sole or principal sources of carbon and energy by any of the species of *Photobacterium*: D-arabinose, L-arabinose, D-fucose, L-rhamnose, cellobiose, melibiose, lactose, inulin, salicin, cellulose, saccharate, mucate, D-galacturonate, formate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate, isovalerate, caproate, heptanoate, caprylate, pelargonate, oxalate, malonate, maleate, glutarate, adipate, pimelate, suberate, azelate, sebacate, D-tartrate, L-tartrate, meso-tartrate, DL-β-hydroxybutyrate, glycolate, citrate, α-ketoglutarate, aconitate, levulinatate, citraconate, itaconate, mesaconate, erythritol, D-mannitol, D-sorbitol, meso-inositol, adonitol, ethylene glycol, propylene glycol, 2,3-butanediol, methanol, ethanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, D-mandelate, L-mandelate, benzoyl formate, benzoate, o-hydroxybenzoate, m-hydroxybenzoate, p-hydroxybenzoate, phenylacetate, quinate, glycine, D-α-alanine, β-alanine, L-leucine, L-isoleucine, L-norleucine, L-valine, L-lysine, L-arginine, L-ornithine, L-citrulline, γ-aminobutyrate, δ-aminovalerate, L-histidine, L-tyrosine, L-phenylalanine, L-tryptophan, D-tryptophan, anthranilate, m-aminobenzoate, p-aminobenzoate, methylamine, ethanoloamine, benzylamine, putrescine, spermine, histamine, tryptamine, butylamine, α-amylamine, 2-amylamine, pentylamine, betaine, sarcosine, creatine, hippurate, pantothenate, acetamide, nicotinate, nicotinamide, trigonelline, allantoin, adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil. For Symbols see standard definitions.

Tableau III C: Caractères des espèces d'*Aeromonas*  
(d'après le Bergey's Manual, 1984).

Characteristics	1. <i>A.</i>	2. <i>A.</i>	3. <i>A.</i>	4. <i>A. salmonicida</i> subsp.			<i>P.</i>
	<i>hydrophila</i>	<i>caviae</i>	<i>soôria</i>	<i>salmonicida</i>	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>	<i>shigelloides</i>
Motility	+	+	+	-	-	-	+
Monotrichous flagellation in liquid medium	+	+	+	-	-	-	-
Lophotrichous flagellation in liquid medium	-	-	-	-	-	-	+
Cocci bacilli in pairs, chains and clumps	-	-	-	+	+	+	-
Rods in singles and pairs	+	+	+	-	-	-	+
Brown water-soluble pigment	-	-	-	+	-	-	-
Growth in nutrient broth at 37°C	+	+	+	-	-	-	+
Indole production in 1% peptone water	+	+	+	-	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	-	+	-	+	-
Growth in KCN broth (Møller technique)	+	+	-	-	-	-	-
L-Histidine and L-arginine utilization	+	+	-	-	-	-	-
L-Arabinose utilization	+	+	-	+	-	+	-
Fermentation of salicin	+	+	-	d	d	d	-
Fermentation of sucrose	+	+	+	-	+	+	-
Fermentation of mannitol	+	+	+	+	-	+	-
Breakdown of inositol	-	-	-	-	-	-	+
Acetoin from glucose (Voges-Proskauer)	+	-	d	-	-	+	-
Gas from glucose	+	-	+	+	-	+	-
H <sub>2</sub> S from cysteine	+	-	+	-	-	+	-

\* Symbols: +, typically positive; -, typically negative; d, differs among strains.