

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE
L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**BACTERIES PATHOGENES INDIGENES
DES EAUX ESTUARIENNES : CAS DES VIBRIOS**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Dominique FOUCHE

Juin 1993

R. INT. DEL/93.06/LA TREMBLADE



IFREMER
 B.P. 133
 17 390 LA TREMBLADE

AUTEURS Dominique FOUCHE Laboratoire Côtier DEL/La Tremblade	CODE : R. INT. DEL N° 93.06 La Tremblade
TITRE BACTERIES PATHOGENES INDIGENES DES EAUX ESTUARIENNES : CAS DES VIBRIOS	date : 08/06/93 tirage nb : 45 Nb pages : 81 Nb figures : 19 Nb photos : /
CONTRAT (intitulé) N° _____	DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RESUME

De nombreuses bactéries, peuplant habituellement les zones estuariennes, se révèlent être de plus en plus fréquemment des agents de maladies dont les vecteurs principaux sont les coquillages et leur consommation par l'homme. Le présent travail synthétise l'état des connaissances sur les vibrios, en particulier *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*, bactéries pour lesquelles il existe une abondante littérature. L'écologie, le pouvoir pathogène et les milieux de culture les plus couramment utilisés en vue de leur détection sont présentés. Enfin, leur interaction avec les mollusques bivalves, leur survie dans ceux-ci et le problème de l'épuration conséquente de ces derniers sont abordés.

Mots clé : *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, bactéries indigènes, estuaires, bivalves, purification.



SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION</i>	1
<i>DONNEES GENERALES</i>	2
<i>1 - VIBRIO CHOLERAE</i>	6
<i>Introduction.</i>	6
<i>1.1. Distribution</i>	7
1.1.1. Rôle de la matière organique	8
1.1.2. Relations avec la pollution fécale	8
1.1.3. Rôle du zooplancton	9
1.1.4. Rôle de la température et de la salinité	10
1.1.5. Rôle de divers autres paramètres	11
<i>1.2. Cycle saisonnier et mécanisme de survie</i>	11
1.2.1. Pays froids et tempérés	11
1.2.2. Pays tropicaux	12
1.2.3. Schéma de survie	12
<i>1.3. Caractères physiques et biochimiques</i>	13
<i>1.4. Pathogénicité</i>	14
1.4.1. Mode d'action des toxines et autres facteurs de virulence	14
1.4.1.1. <i>Vibrio cholerae O1</i>	14
1.4.1.2. <i>Vibrio cholerae non O1</i>	15
1.4.2. Structure antigénique et virulence	16
1.4.3. Cas de <i>Vibrio cholerae O1</i>	17
1.4.4. Epidémiologie	19
<i>Conclusion</i>	21
<i>2 - VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i>	22
<i>Introduction</i>	22
<i>2.1. Distribution</i>	22
2.1.1. Rôle de la matière organique	23
2.1.2. Relations avec la pollution fécale	23
2.1.3. Rôle du zooplancton	24
2.1.4. Rôle de la température et de la salinité	25
2.1.5. Rôle de divers autres paramètres	25

2.2. <i>Cycle saisonnier et mécanisme de survie</i>	26
2.2.1. Pays froids et tempérés	26
2.2.2. Pays tropicaux	27
2.3. <i>Caractères physiques et biochimiques</i>	29
2.4. <i>Pathogénicité</i>	29
2.4.1. Mode d'action des toxines et autres facteurs de virulence	29
2.4.2. Structure antigénique et virulence	30
2.4.3. Phénomène Kanagawa	31
2.4.4. Epidémiologie	33
<i>Conclusion</i>	33
3 - <i>VIBRIO VULNIFICUS</i>	35
<i>Introduction</i>	35
3.1. <i>Distribution</i>	35
3.2. <i>Cycle saisonnier et mécanisme de survie</i>	36
3.3. <i>Caractères physiques et biochimiques</i>	38
3.4. <i>Pathogénicité</i>	38
3.4.1. Mode d'action des toxines et autres facteurs de virulence	38
3.4.2. Structure antigénique et virulence	39
3.4.3. Epidémiologie	39
<i>Conclusion</i>	40
4 - <i>VIBRIOS ET BIVALVES</i>	41
4.1. <i>Problématique en Europe</i>	41
4.1.1. Généralités	41
4.1.2. Zones d'élevage	41
4.1.3. Zones de pêche à pied	42
4.2. <i>Interaction entre les bivalves et les bactéries</i>	42
4.2.1. Généralités	42
4.2.2. Processus d'accumulation des vibrios	44
4.3. <i>Survie des vibrios dans les bivalves en conservation</i>	46
4.4. <i>Purification</i>	48
4.4.1. Par reparquage	48
4.4.2. Par Ultra Violet	49
4.4.3. Par ionisation	50

<i>CONCLUSION</i>	51
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	53
<i>ANNEXES</i>	64
<i>GLOSSAIRE</i>	75

INTRODUCTION

Si les microorganismes pathogènes les mieux étudiés sont les bactéries et virus d'origine fécale, qui transitent dans les eaux usées et atteignent les zones d'élevage conchylicole et de pêche récréative, il faut garder présent à l'esprit que de nombreuses bactéries appartenant au milieu marin (bactéries indigènes) peuvent provoquer des infections et des épidémies dont la gravité n'est pas négligeable.

C'est le cas entre autres, des bactéries du genre *Vibrio*. Trois d'entre elles sont particulièrement impliquées dans des pathologies humaines, ce sont : *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*. Les pathogénicités liées à ces trois espèces sont respectivement :

- après ingestion de produits de la mer : respectivement choléra, diarrhées, septicémie,
- par contact : infections primaires ou infection de blessures déjà existantes

Aucune revue bibliographique n'a été, à notre connaissance, publiée sur ce sujet. Or l'identification épisodique de ces bactéries dans notre pays (avec le risque sanitaire lié à leur présence) se heurte à une littérature vaste et dispersée, aussi l'intérêt de ce travail est-il de la regrouper et de tenter par là même une description de ces bactéries.

Ces bactéries seront d'abord situées dans un contexte plus général, celui des bactéries autochtones dont elle font partie, avec les particularités expliquant leur adaptabilité dans le milieu marin et ensuite celui de la classification actuellement en vigueur.

Ensuite nous tenterons une description de chacune d'entre elles sous les angles suivants : écologie, caractères spécifiques, pathogénicité et épidémiologie.

Enfin leurs relations particulières avec les bivalves sera évoquée, tant du point de vue de la contamination que de l'épuration, sans oublier les problèmes inhérents au stockage des produits finis. Ceci nous permettra de mieux comprendre les risques d'intoxication chez l'homme. Les méthodes d'analyse servant à leur identification seront brièvement passées en revue en annexe de ce rapport.

Cette première partie, relative aux bactéries indigènes pathogènes, s'inscrit dans un contexte de recherche bibliographique plus vaste au cours de laquelle nous souhaitons aborder et décrire d'autres agents bactériens ou viraux pathogènes pour l'homme.

DONNEES GENERALES

Les bactéries indigènes du milieu marin sont souvent appelées bactéries autochtones et sont impliquées dans la décomposition et dans la production primaire. Mal connues sont les autotrophes, mieux connues sont les hétérotrophes, dont certaines sont susceptibles d'engendrer des maladies chez l'homme. La plupart des bactéries estuariennes sont des hétérotrophes, bactéries auxquelles il est nécessaire de fournir un ou plusieurs métabolites, essentiels pour leur croissance, car elles ne peuvent pas les synthétiser.

Les estuaires, du fait d'une dynamique extrêmement instable, sont occupés par des bactéries qui changent d'habitat de façon périodique ou apériodique. Nombre de ces bactéries sont définies comme des "r. stratégistes" ou copiotrophes : elles ont la capacité de survivre dans des conditions de famine à un stade viable mais qui n'est pas cultivable ou alors de se développer de manière très importante face à des taux non limitants d'éléments nutritifs organiques. D'autres sont des "k. stratégistes" ou oligotrophes : leur capacité à utiliser de faibles taux d'éléments nutritifs organiques est grande.

Le critère "autochtone" a été défini comme il suit par Alexander : (cité par Grimes, 1991)

- présence répétée dans l'habitat
- capacité à utiliser substrats et éléments nutritifs de l'habitat
- capacité à tolérer les conditions extrêmes de l'habitat
- présence à fortes densités de population.

Costerton et al., suggèrent que les bactéries gram (-) s'adaptent bien à l'existence dans les eaux diluées d'estuaires : ils ont remarqué que dans ce milieu elles retiennent assez bien leurs enzymes de dégradation en étroite association avec l'enveloppe cellulaire (i.e. la paroi cellulaire, le périplasme et la membrane extérieure) (Tab.1). La découverte du stade "viable non cultivable" (VNC) montre que les gram (-) sont aussi plus adaptables que les bactéries gram (+) lorsqu'il y a une pénurie d'éléments nutritifs (Grimes, 1991)

Ce stade VNC est bien décrit par Grimes (dans Plusquellec, 1992) :

- a - Culture** - Pas de croissance sur ou dans les milieux de culture standard
Recouvrement de l'aptitude à croître dans des conditions appropriées.
- b - Cytologie** - Les cellules apparaissent intactes par les techniques de dénombrement direct à l'acridine orange et les techniques avec anticorps fluorescents.

Les cellules réagissent au substrat

Il y a changement éventuellement dans la taille ou la forme

- c - Virulence** - Les bactéries VNC restent virulentes.
- d - Plasmides** - Les plasmides sont conservés

Table 1 : Adaptations des bactéries gram (-) facilitant leur vie dans les milieux aquatiques (d'après Grimes, 1991)

Adaptation	Avantage sélectif
Membrane externe (ME)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Le lipopolysaccharide LPS est le principal constituant de cette membrane. 2. Elle contient des pores qui permettent une diffusion rapide des petits nutriments hydrophiles (par ex. les disaccharides, les acides aminés, les ions inorganiques) mais qui excluent les composés plus gros. 3. Elle contient de petites protéines de transport et de réception qui facilitent le transport des grosses molécules. 4. Elle peut faciliter la capture d'ADN libre et ensuite sa transformation.
Lipopolysaccharide (LPS)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Il possède des liaisons non covalentes et est stabilisé par des cations divalents. Des métaux lourds toxiques peuvent déplacer ces cations, il y aurait alors formation de protrusions sur la ME permettant d'éloigner ces métaux de la cellule. 2. Il rejette les composés organiques bactéricides. 3. Il est un récepteur des bactériophages (permet la transduction et donc le réarrangement génétique) 4. Il séquestre les nutriments. 5. Il est antiphagocyte. 6. Il résiste à la capture passive de composés hydrophobes. 7. Il est responsable d'une forte électronégativité de surface. 8. Il est responsable de la résistance aux détergents, aux antibiotiques hydrophobes, aux sels biliaires, aux protéases et aux lipases.
Espace périplasmique	<ol style="list-style-type: none"> 1. Il contient environ 50 sortes de protéines qui fonctionnent comme des enzymes d'hydrolyse ou des protéines de transport ou des chimio récepteurs dans le chimiotactisme. 2. Il contient des nutriments, des enzymes extracellulaires et des produits de rejet en transit
Paroi cellulaire mince	<ol style="list-style-type: none"> 1. Son enveloppe souple est constituée d'une monocouche moléculaire, fréquemment perforée avec les jonctions de Bayer. 2. La minceur et la discontinuité de cette paroi peuvent faciliter une réduction rapide de la taille des cellules au moment où le milieu s'appauvrit (stade VNC).
Plasmides	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mécanisme qui permet l'échange rapide de gènes non chromosomaux 2. Ils peuvent s'intégrer ou non au chromosome, et facilitent de ce fait la mobilité génétique et la variabilité. 3. Ils peuvent permettre une réponse rapide aux fluctuations de l'environnement (par ex. biodégradation et attachement).
Pili	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ce sont des organelles de fixation (facteurs d'adhérence ou de colonisation). 2. Ils sont aussi récepteurs de bactériophages
Temps de génération court (g)	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>In vitro</i> il est de 15 à 20 min. lorsque les conditions sont optimales ; <i>in situ</i>, il est variable, mesurable en termes d'heures. 2. En général g (gram-) > g (gram+)
Flagelle polaire	<ol style="list-style-type: none"> 1. Il est responsable du déplacement rapide de la plupart des bactéries gram (-) 2. Il peut initier une fixation sur des surfaces solides
Flagelles latéraux	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ils sont responsables de la fixation sur des surfaces solides. 2. Ils sont responsables d'autres types de déplacements sur milieu solide : l'essaimage ou "swarming"
Formation de cellules dormantes	<ol style="list-style-type: none"> 1. C'est la miniaturisation des cellules associée à des changements cytochimiques permettant la survie dans des conditions difficiles. 2. Le métabolisme endogène et les besoins énergétiques sont réduits. 3. Les prédateurs évitent ces cellules. 4. La surface des cellules devient hydrophobe, permettant peut-être la fixation sur des substrats solides.

D'après le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baumann et Schubert, 1984), le genre *Vibrio* appartient à la famille des *Vibrionaceae*, ordre des *Spirillales*. La famille des *Vibrionaceae* partage un certain nombre de points communs avec la famille de *Enterobacteriaceae*, ce qui laisse préjuger d'une origine commune. Actuellement, cette famille inclut les genres *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* et *Plesiomonas* ; il est suggéré que le genre *Aeromonas* soit exclu de cette famille et re-nommé.

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles gram (-), mobiles grâce à un flagelle polaire monotriche contenu dans un manchon prolongeant la membrane extérieure et aussi grâce à des flagelles latéraux péritriches présents chez certaines espèces. La plupart sont oxydase positives (présence des cytochromes de type C). Elles sont anaérobies facultatives, capables d'un métabolisme respiratoire et d'un métabolisme fermentatif. Elles utilisent toutes le D-glucose comme principale source de carbone et d'énergie. La plupart utilisent les sels d'ammonium comme seule source d'azote. La plupart requièrent 2-3% de NaCl dans une base d'eau de mer pour une croissance optimale. Un pH élevé entre 7,6 et 9 facilite leur multiplication. Elles ne forment pas d'endospores ou de microcystes.

Les vibrios supportent des échanges génétiques par le biais des plasmides ; ceux-ci sont échangés ou apportés à la bactérie par les bactériophages qui profitent de la lyse d'une autre bactérie pour s'emparer d'un fragment de chromosome et l'introduire dans la première bactérie. Le transport de plasmides est tout de même assez sporadique chez les *Vibrionaceae*. Les vibrios sont soumis à d'autres attaques telles que celles des vibriocines (bactériocines) substances chimiques antibiotiques élaborées par des bactéries de la même famille ou encore les agressions des Bdellovibrios qui s'en servent comme hôte. Ces processus aboutissent à la lyse bactérienne

Plusieurs antigènes permettent à l'intérieur d'une même espèce, de classer les souches en sérotypes (différents caractères antigéniques) eux-mêmes divisés en biotypes (différents caractères biochimiques) ou lysotypes (sensibilités différentes aux bactériophages), Ces antigènes sont : l'antigène somatique O, l'antigène flagellaire H et l'antigène de surface K.

C'est grâce à l'étude des caractères conventionnels et nutritionnels (identification biochimique), à l'étude du génome (études des antigènes totaux et hybridation ADN/ARN) puis à l'analyse des acides gras cellulaires, qu'on a pu individualiser 31 espèces de vibrios (Urdaci-Bertran, 1987 ; Richard, 1992). L'analyse des acides gras est une méthode qui permet également de séparer facilement le genre *Vibrio* du genre *Aeromonas*, l'identification par les caractères biochimiques étant parfois insuffisante (Urdaci-bertran, 1987).

Les vibrios font partie des habitants primaires de l'eau de mer et ils s'y trouvent en association avec des animaux aquatiques dans un large éventail de salinités. On peut affirmer avec quasi certitude maintenant que les zones estuariennes constituent une des niches

écologique de certains d'entre eux, en particulier de *V. alginolyticus*, *V. cholerae non O1*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, et *V. vulnificus*. Ces bactéries sont décrites comme des espèces pathogènes opportunistes pour l'homme (parmi les dix répertoriées dans le genre *Vibrio*), les poissons et autres vertébrés et invertébrés.

N.B. Le sérotype *O1* de *V. cholerae* est plus fragile dans l'eau que le sérotype *non O1* s'il n'y a pas d'apports d'origine anthropique (Urdaci-Bertran, 1987). Son appartenance au groupe des bactéries autochtones du milieu estuarien serait plus contesté de ce point de vue.

1 – *VIBRIO CHOLERAE*

Introduction

Jusqu'à présent, cette espèce comportait deux groupes :

- * les *Vibrio cholerae* O1 (agglutinés par le sérum polyvalent anticholérique O:1)

V. cholerae biotype *cholerae* ou "classique" – agent du choléra

V. cholerae biotype *El Tor* – agent d'un choléra moins grave

- * les *Vibrio cholerae non O1* (non agglutinés par le sérum anti O:1)

Ils sont des agents de diarrhées quasi cholériques et de gastroentérites

Ils appartiennent aux groupes I, II et V (*V. mimicus*) de Heiberg (Urdaci–Bertran, 1987 ; Richard, 1992) et se répartissent selon une centaine de sérogroupes.

A l'heure actuelle, il y a confusion entre les appellations de *V. cholera* O1, vibrios non cholériques et vibrios non agglutinables.

V. cholerae est liée à des cas de choléra, de septicémies, de méningoencéphalites et de diarrhées pseudo-cholériques. Répertoire dans diverses parties du monde, le *V. cholerae* O1 est souvent la cause d'épidémies. Par exemple :

– en Asie, on connaît l'épidémie qui a sévi à Hong Kong en 1964 (Cabane, 1982), ainsi que les épidémies périodiques arrivant au cours des mois de septembre – octobre de chaque année au Bangladesh (Tamplin et al., 1991). Les sérotypes incriminés et détectés chez les malades sont les *V. cholerae* O1 biotype *El Tor* à Hong Kong et *V. cholerae* biotype "classique" et *El Tor* au Bangladesh.

– aux USA, des cas de choléra ont été répertoriés en Louisiane (dus à des crabes mal cuits) et au Texas, respectivement en 1978 et en 1973 (Grimes, 1991) tandis que la forte épidémie qui sévit depuis 1991 en Amérique du Sud se répand actuellement dans certaines parties Sud des USA et devient une véritable pandémie. Le choléra (épidémique ou endémique) avait disparu des Amériques depuis plus de cent ans et l'origine de son apparition est inconnue (Glass et al., 1992).

– en Europe, plusieurs épidémies de choléra se sont déclarées dans les deux décennies passées une en Tunisie pendant l'été 1973 puis une en Italie à Naples en septembre de la même année (contamination par des moules) (cité par Cabane 1982), une autre au Portugal en 1974 (contamination par des coques crues ou mal cuites) (Prieur et al., 1990). Un foyer de choléra existe également dans la province de Navarre en Espagne, et la bactérie responsable (*V. cholerae* *El Tor* sérotype Ogawa) est maintenant systématiquement recherchée dans les eaux

de surface, les eaux souterraines et les eaux résiduaires de certaines zones (Urdaci-Bertran, 1987)

D'autres épidémies furent également enregistrées dans diverses parties du globe (Asie Mineure, URSS) et à partir de 1966, on considéra que le monde entrait dans la période du choléra dit "moderne" avec la 7ème pandémie (Urdaci-Bertran, 1987).

Par contre des sérotypes *O1* biotype analogue à *El Tor*, détectés dans des milieux aquatiques saumâtres, en particulier dans le Kent en Angleterre, se sont révélés exempts de pouvoir pathogène pour l'homme (West et Lee, 1982).

La souche *non O1* est également détectée dans de très nombreuses zones côtières et aussi à l'intérieur des terres, causant ou non des infections (Hood et al., 1984 ; Urdaci et al, 1988 ; Grimes, 1991)

1.1. Distribution

V. cholerae est une bactérie estuarienne, largement répandue dans les pays froids et dans les pays chauds ; sa survie dans ce milieu peut être très longue, de quelques semaines jusqu'à 5 ans (Hood et Ness, 1982 ; Colwell et al., 1984 ; Tamplin et al., 1990 ; Grimes, 1991). Le groupe *non O1* est le plus fréquent, mais il semble que le groupe *O1* (capable de produire la toxine) ait aussi une niche écologique dans les eaux saumâtres du Nord de l'Europe (West et Lee, 1982), l'épidémie de 1974 au Portugal confirme son adaptabilité aux eaux tempérées (Prieur et al, 1990).

D'un point de vue spatial, sa faculté de s'accrocher à des substrats divers est telle qu'on la trouve dans toute la colonne d'eau pendant la période d'abondance : sur les jacinthes d'eau (Spira et al., dans Grimes, 1991), dans les algues et les roseaux (West et Lee, 1982), sur le phytoplancton (Tamplin et al., 1990), sur le CaCO₃ (carbonate de calcium) et sur les silicates (Mac Donell et al., 1984) et essentiellement sur le zooplancton (Huq et al., 1984, Tamplin et al., 1990). On la trouve aussi dans le sédiment associée à des débris.

Tout comme *V. parahaemolyticus*, elle appartient à la microflore estuarienne et se trouve hébergée par divers animaux : Hood et al. (1984) l'ont trouvée dans 45% des huîtres, plus abondante lorsque des particules détritiques et du phytoplancton s'y trouvent aussi (concentration des bactéries par activité alimentaire) ainsi que dans 67% des crabes bleus où elle s'établit dans les branchies, l'exosquelette, le tractus digestif et les structures chitineuses externes (Colwell et al., 1984). Elle est détectée également chez de nombreuses espèces d'oiseaux aquatiques (Grimes, 1991) et dans le guano des mouettes (Lee et al, 1984).

D'autres observations laissent penser que *V. cholerae non O1* aurait un lien particulier avec les crabes.

V. cholerae O1 persiste aussi chez des porteurs sains.

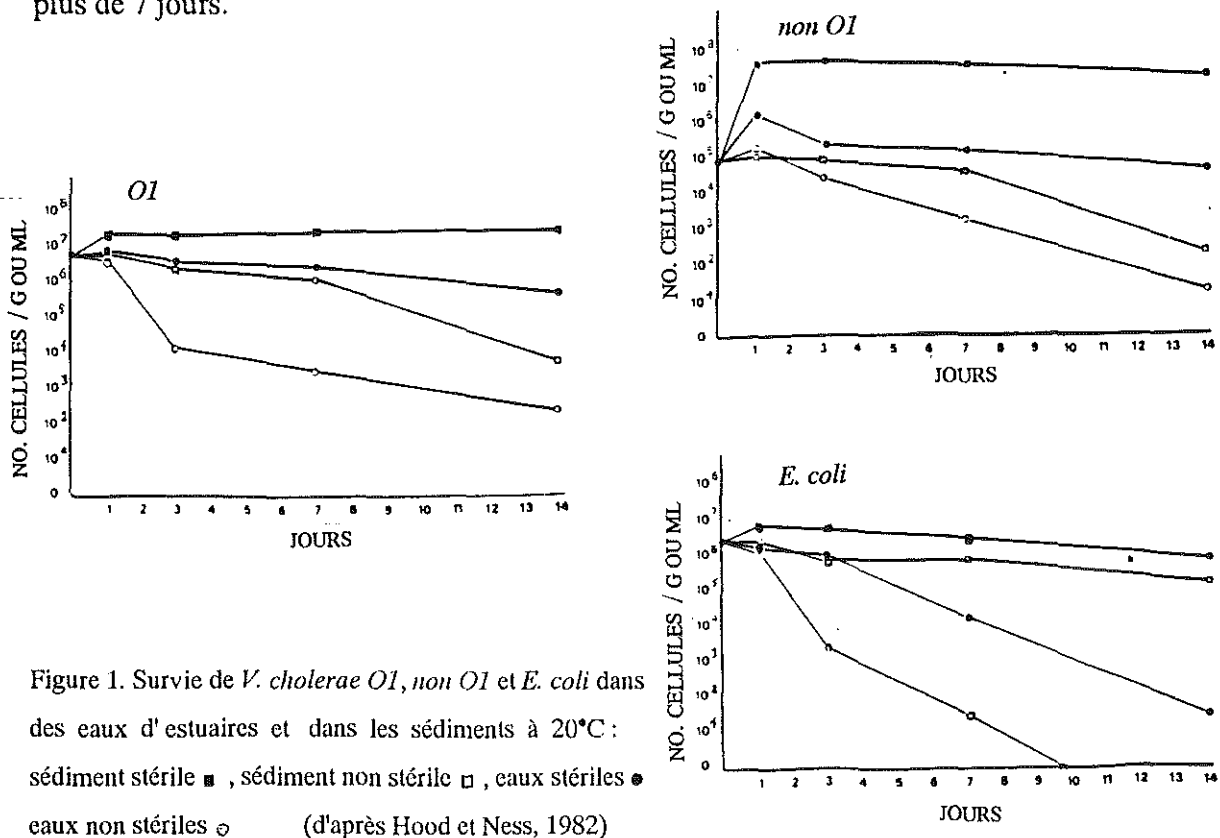
1.1.1. Rôle de la matière organique et des particules

Elle profite de la matière particulaire organique (zooplancton) et minérale (CaCO_3 et silicates) pour vivre et se développer à un stade épibiotique, qui semble bien être un préférendum. Ce stade est peut-être une adaptation aux stress générés par la mobilité du milieu estuarien. (Colwell et al., 1984 ; Hood et al., 1984 ; Mac Donell et al., 1984 ; Tamplin et al., 1990).

1.1.2. Relations avec la pollution fécale

Plusieurs auteurs ont observé que sa présence n'était pas corrélée à celle d'*Escherichia coli* dans le milieu (Hood et Ness, 1982 ; Colwell et al., 1984 ; Lee et al., 1984). Cette absence de corrélation est également notée par Urdaci-Bertran (1987) lors des prélèvements effectués à proximité d'émissaires d'égoût dans la province de Navarre.

Des études *in vitro* sur la survie comparée de *V. cholerae* et *E. coli* ont montré que *V. cholerae* survit mieux dans l'eau tandis que *E. coli* survit mieux dans les sédiments (Hood et Ness, 1982) (Fig. 1). Mêmes résultats dans l'étude de Guthrie et Scovill (1984) où *V. cholerae* survit de 6 à 12 jours dans de l'eau salée (7 à 25 g/l de NaCl) tandis que *E. coli* ne survit jamais plus de 7 jours.



D'autres auteurs ont par contre mis en évidence une faible relation positive entre les deux espèces à travers l'étude de zones salubres et non salubres, ces dernières abritant le taux le plus élevé de vibrios, etc... (Hood et Ness, 1982 ; Rodrick et al., 1984) ; en Australie, Eyles et Davey (1988) ont montré que la présence de ces deux bactéries était gouvernée par des facteurs qui diffèrent et d'autres qui se chevauchent.

Ces études posent fortement le problème de la pertinence de *E. coli* comme indicateur de la présence de *V. cholerae* dans le milieu.

Les échanges génétiques entre ces deux bactéries par transfert de plasmides est démontrée ; en effet la similitude existant entre les entérotoxines de *V. cholerae* et de *E. coli* permettent de penser qu'il y a un transfert du pouvoir pathogène, par le biais du plasmide, de l'une à l'autre (Cabane, 1982) et de résistance aux antibiotiques et métaux lourds dans le sens inverse.

1.1.3. Rôle du zooplancton

V. cholerae se trouve dans la colonne d'eau en association étroite avec les copépodes. Le point d'attache se situerait au niveau de la région orale et vers les sacs à oeufs ; il a même été observé des division cellulaires sur ces derniers (Huq et al., 1984). Tamplin et al. (1990) ont observé quant à eux un attachement préférentiel aux exuvies : leurs études ont été menées à partir de souches O1 isolées chez des patients du Bangladesh. Colwell et al. (1984) suggèrent l'existence d'une relation commensale entre *V. cholerae* et les copépodes : il y aurait séquestration par la bactérie des ions Na^+ du copépode par action de la toxine sur les cellules épithéliales de celui-ci, ces ions étant utiles à la bactérie lorsque la salinité du milieu tombe en dessous du niveau tolérable. Ces auteurs ont toujours constaté une meilleure survie et un meilleur taux de multiplication en présence de ces copépodes, ceci grâce à la chitine qui servirait d'élément nutritif. (Fig. 2)

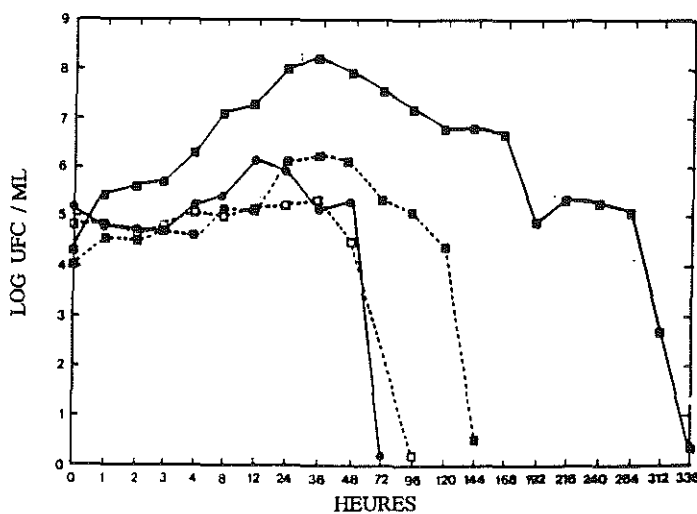


Figure 2. Croissance de *V. cholerae* "classique" Inaba dans des flacons contenant de l'eau seule (Rivière Patuxent) □-□, de l'eau + copépodes vivants + algues ■-■ de l'eau + copépodes morts ▣-▣, de l'eau + algues ●-● (S= 15g/l). (Huq et al. 1984)

1.1.4. Rôle de la température et de la salinité

C'est une bactérie qui apprécie les eaux tempérées, voire chaudes. Selon les régions, les comptages maxima sont effectués pour des températures comprises entre 15 et 35°C ; un optimum de 21– 28°C a été calculé dans une étude statistique de Seidler et Evans (1984) sur quatre zones américaines. Dans le Kent, West et Lee (1982) ne la retrouvent pas si la température est inférieure à 9°C.

Par contre, les salinités optimales sont plutôt basses : la plus forte moyenne géométrique des dénombrements de *V. cholerae* calculée par Seidler et Evans se situe à salinité inférieure à 5 g/l. Elle peut être retrouvée avec des salinités encore plus faibles en Angleterre (West et Lee, 1982) mais aussi avec des salinités de 37 g/l en Australie (Eyles et Davey, 1986). Elle possède également un mécanisme de pompe à sodium : des études en laboratoire effectuées avec les deux principaux sels de l'eau de mer (NaCl et MgCl₂) montrent que ce sont surtout des variations du chlorure de sodium qui affectent la bactérie, en diminuant le transport des acides aminés (Colwell et al., 1984 ; Urdaci-Bertran, 1987).

La salinité est un paramètre très important dans son écologie.

Dans le milieu estuarien, la présence conjuguée d'optimums de ces paramètres est nécessaire. Voici quelques propositions :

S = 3 g/l	T = 15 °C	(West et Lee, 1982)
S = 2 à 20 g/l	T = 20 à 35°C	(Singleton et al., 1982)
S = 12 à 25 g/l	T = 20 à 35°C	(Hood et Ness, 1982)
S < 5 g/l	T = 21 à 28°C	(Seidler et Evans, 1984) (Fig. 3 et 4)

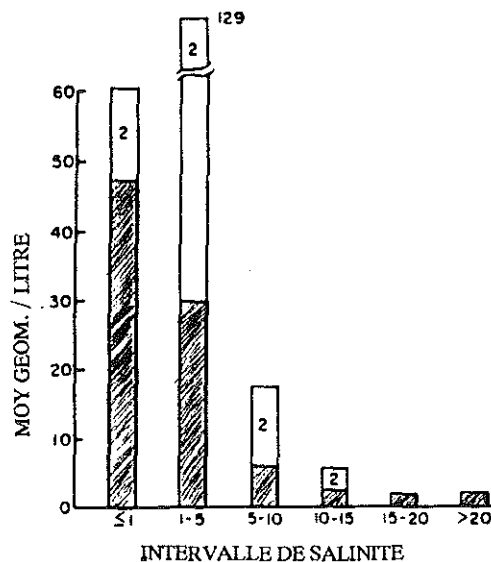
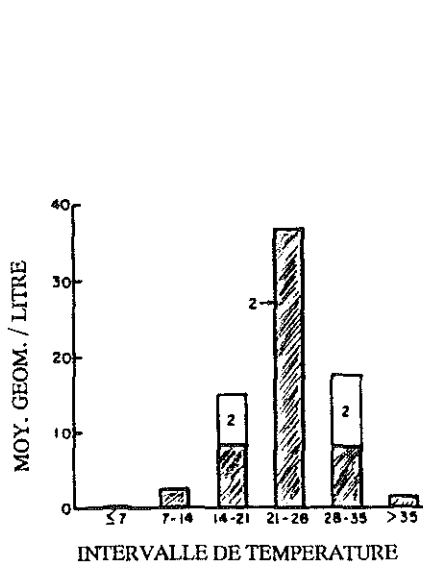


Figure 3. Moyenne géométrique des comptages de *V. cholerae* en fonction d'intervalles de température de l'eau.

Figure 4. Moyenne géométrique des comptages de *V. cholerae* en fonction d'intervalles de salinité de l'eau.

(le nombre "2" représente le comptage pour la Louisiane)

Ces derniers auteurs ont formulé une équation donnant les valeurs prédictives de *V. cholerae* (jusqu'à 150 cellules/l) :

$$\text{LNVC} = -C + T - T^3 - TS + TS^2$$

dans laquelle LNVC est le log du nombre de *Vibrio cholerae*

C est une constante

T est la température

S est la salinité

1.1.5. Rôle de divers autres paramètres

Plusieurs auteurs ont mis en évidence une sensibilité particulière de cette bactérie aux pH acides. A pH inférieur à 7 elle ne survit pas dans les cultures de Guthrie et Scovill (1984) tandis que l'on voit des souches de *V. cholerae* se développer à pH 10 (Urdaci-Bertran, 1987). L'optimum de croissance dégagé par Seidler et Evans (1984) se situerait entre 7,2 et 7,4.

Les bactéries privées de nutriments sont sensibles à la pression osmotique (Mac Donell et al., 1984).

1.2. *Cycle saisonnier et mécanisme de survie*

1.2.1. Pays froids et tempérés

Il est possible de dégager deux périodes gouvernées par la température et plus significativement par la présence de crustacés (Huq et al., 1984) :

– hiver et printemps

D'une manière générale, lorsque la température tombe au dessous d'un niveau minimal c'est à dire 8 à 10°C pour Seidler et Evans (1984) et Huq et al. (1984) et/ou lorsque la quantité de nutriments est insuffisante et/ou lorsque la salinité augmente, la bactérie adopte l'état VNC (voir *Données Générales*). D'un point de vue métabolique, il y aurait réduction de l'activité respiratoire, déplétion des réserves cellulaires, arrêt des synthèses de protéines et d'acides nucléiques (Gauthier et Pietri, 1989). Les cellules deviennent plus rondes et plus petites, sans changement de membrane cytoplasmique : certaines deviennent des microvibrios (0,2µm), ou encore des ultramicrovibrios (Hood et al., 1984). Elles requièrent alors très peu d'éléments nutritifs. Certains microvibrios changeraient même de sérotypes (Hood et al., 1984), mais par contre garderaient un pouvoir pathogène correspondant aux signes cliniques de *V. cholerae non O1* (Rodrick et al, 1984).

West et Lee (1982) et Huq et al. (1984) pensent que cette survie hivernale se passe dans les animaux (crustacés, poissons, mollusques, oiseaux) et non dans le sédiment ; avis non

partagé par Byrd et al. dans Grimes (1991) qui l'associent à la faune benthique et aux débris chitineux du sédiment.

– été et automne

D'après des études de laboratoire effectuées par Xu et al., (1982), c'est une montée graduelle de température qui permet à la bactérie de se revivifier et de commencer ses divisions cellulaires ; dans le milieu aquatique, une multiplication bactérienne importante sera alors favorisée par la chitine des copépodes et une température d'environ 17°C selon Colwell et al. (1984) et Lee et al. (1984).

1.2.2. Pays tropicaux

Le cycle de *V. cholerae* (séro groupe *O1*) est relié aux saisons sèches et humides. Au Bangladesh, pendant la mousson, le niveau d'éléments nutritifs étant au plus bas, les vibrios ne sont pas détectés car ils survivent au stade VNC. L'épidémie annuelle démarre juste après la mousson, en septembre–octobre de chaque année, lorsque le bloom de phytoplancton puis celui de zooplancton se sont succédés (Huq et al., 1984). On retrouve alors les bactéries fixées aux copépodes, à des cellules phytoplanctoniques ou encore à des jacinthes d'eau ... (Tamplin et al., 1990).

1.2.3. Schéma de survie

Les travaux de Hood et al. (1984) et de Mac Donell et al. (1984) permettent d'envisager un schéma global de survie et un cycle pour la bactérie. (voir Fig. 5)

Cette bactérie présente une grande souplesse d'adaptation face aux stress du milieu estuarien. Elle peut métaboliser des hydrates de carbone en aérobie et anaérobie (Younggreen–Grimes et al., 1988), des protéines et des composés organiques xénobiotiques. Sa stratégie de survie est extrêmement efficace du fait de sa capacité à se fixer sur les surfaces les plus diverses (Hood et al., 1984).

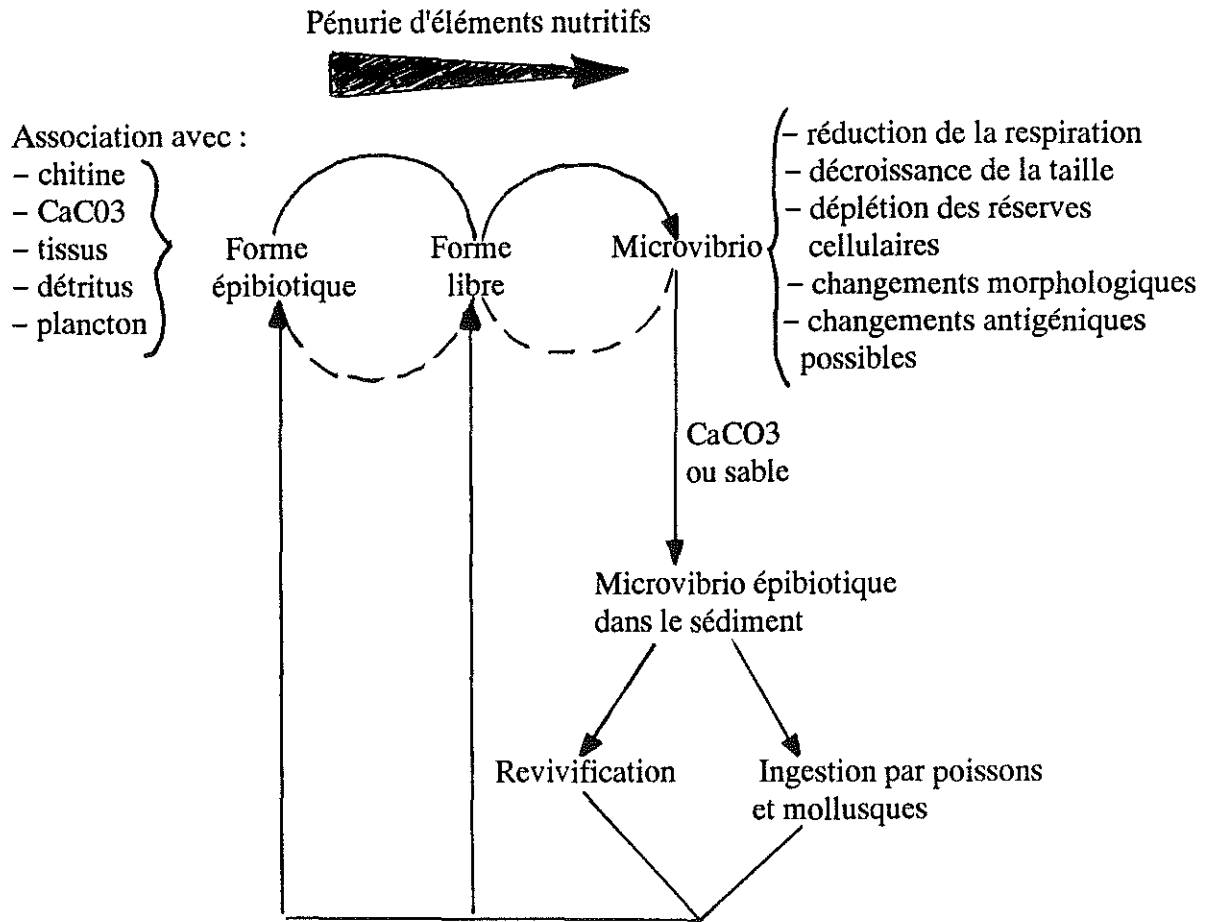


Figure 5. Schéma de survie de *V. cholerae*
(d'après Mac Donell et al., 1984)
(d'après Hood et al., 1984)

1.3. Caractères physiques et biochimiques

Les caractères physiques et biochimiques de *V. cholerae* (O1 et non O1) sont les suivants
gram (-), mobile, taille : 0,5 à 0,8 μ de large 1,4 à 2,6 μ de long
croissance à 43°C

oxydase (+)

réduction des nitrates en des nitrites (+)

H_2S (-)

indole (+)

Voges Proskauer (+) ou (-)

β galactosidase (+) pour la plupart

lysine décarboxylase (+) pour la plupart

ornithine décarboxylase (+)
 arginine dihydrolase (-)
 gélatinase (+)
 uréase (-)
 mannitol (+)
 utilisation du D. glucose (+), saccharose (+), lactose (+) ou (-), mannose (+) ou (-),
 L arabinose (-)
 production de gaz à partir du glucose : (-)
 croissance sur milieu à 0%, 1% et 3% NaCl, plus ou moins sur milieu à 6% NaCl, pas de
 croissance sur milieu à 8% et 10% NaCl
 quelques souches sont bioluminescentes (émission de lumière bleue ou verte grâce à la
 luciférase),
 sensibilité au facteur vibriostatique O/129
 (Baumann et al, 1984 ; Nair et al., 1987; Janda et al., 1988)

N.B. pour un complément d'identification voir en *Annexe 2*.

1.4. Pathogénicité

1.4.1. Mode d'action des toxines et autres facteurs de virulence

1.4.1.1. *Vibrio cholerae* O1

De tous les facteurs de virulence associés aux vibrios pathogènes, seule l'entérotoxine extra cellulaire cholérique CT et sa liaison étroite avec un syndrome intestinal ont été réellement mis en évidence. Lorsque *V. cholerae* est ingéré et atteint le tractus digestif (partie antérieure du duodénum), il se multiplie très rapidement dans la couche de mucus, adhère à la bordure en brosse des cellules pour échapper à la vidange de l'intestin (Urdaci-Bertran et al, 1987) et libère une enzyme, la mucinase. Celle-ci digère l'enveloppe de mucus (dégradation des glycoprotéines) qui protège les muqueuses intestinales et expose ainsi les tissus de l'organisme hôte à une attaque de l'entérotoxine. Lorsque celle-ci est sécrétée, elle s'attache aux récepteurs des cellules intestinales et active alors des enzymes qui permettent une fuite intense d'eau et d'électrolytes que l'intestin est incapable de résorber en aval, d'où une diarrhée aqueuse profuse (Richard, 1992). Cette toxine a été détectée chez tous les *V. cholerae* O1 et curieusement chez quelques souches de *V. cholerae non O1* et sa structure moléculaire est très proche de l'entérotoxine thermolabile élaborée par *Escherichia coli*.

Chez *V. cholerae* O1 biotype *El Tor*, d'autres facteurs pathogènes sont décrits : une toxine instable à la chaleur qui fonctionne comme l'hémolysine de *V. parahaemolyticus* et des enzymes comme des phospholipases, des protéases et des neuraminidases (Baumann et al,

1984 ; Rodrick, 1991). Egalement décrites chez *V. cholerae* O1, biotypes "classique" et ElTor deux cytolysines distinctes sensibles à la chaleur, qui participent à la lyse des cellules, à l'accumulation des fluides (électrolytes et eau) et à la destruction des tissus (Janda et al., 1988).

1.4.1.2. *Vibrio cholerae non O1*

Ils possèdent d'autres facteurs de virulence. On a décrit une hémolysine sensible à la chaleur de type *El Tor*, une hémolysine de type Kanagawa ainsi qu'une entérotoxine thermostable, la NAG-ST (également très semblable à celle produite par *Escherichia coli*). La NAG-ST fut plus particulièrement étudiée par Pal et al. (1992) : ainsi, en présence de facteurs de colonisation adéquats (par ex. des cytolysines) ils ont prouvé qu'une souche *non O1* productrice de NAG-ST pouvait causer une diarrhée comparable à celle du choléra ; leurs études à Calcutta ont montré que l'on trouvait cette toxine dans 2.3% des prélèvements alors qu'on ne trouvait que 1.2% de toxine cholérique. Une cytotoxine de type *Shigella* a été également observée, associée à quelques souches de *V. cholerae non O1* (mais aussi de *O1*) ; elle jouerait un rôle dans les diarrhées à saignement (Janda et al., 1988).

Spira et al, (cité par Urdaci-Bertran, 1987) ont testé l'activité biologique de 102 souches isolées de malades (avec ou sans diarrhées) et du milieu naturel et exposent les résultats suivants :

72 isolats de malades diarrhéiques	30 isolats du milieu naturel
24%⇒ toxine cholérique de type CT	7%⇒ toxine cholérique de type CT
8% ⇒ non toxinogène	27%⇒ non toxinogène
68%⇒ entérite sans sécrétion de CT	60%⇒ entérite sans sécrétion CT

Il y a des controverses, chez les différents auteurs, sur la similitude entre l'entérotoxine parfois sécrétée par *V. cholerae non O1* et la toxine cholérique (CT) de *V. cholerae O1*.

Pour permettre à ces toxines d'agir, l'adhérence de la bactérie aux cellules est nécessaire et constitue une des étapes importantes de la pathogénie. Chez les espèces les plus virulentes on soupçonne le flagelle de jouer un rôle clé dans ce processus, rôle controversé par Veron et Popoff (cités par Douet, 1992). La présence de pili est synonyme d'agglutination des érythrocytes (Janda et al., 1988). Le LPS semble jouer également un rôle très important (Douet, 1992). L'adhérence sur les microvillosités des membranes et l'agglutination des érythrocytes humains du groupe O par *V. cholerae* en milieu liquide requièrent la présence de Ca^{++} et sont inhibés par le L-glucose ; par contre sur milieu solide *V. cholerae* ne possède pas ces propriétés d'adhérence et d'agglutination. Levine et al, montrent qu'il y a une

prédominance de cas de choléra grave chez des sujets de groupe sanguin O (Urdaci-Bertran, 1987 ; Glass, 1992).

La chimiotaxie et la mobilité constituent également des facteurs de virulence importants dans le choléra expérimental (Urdaci-Bertran, 1987).

Les souches cliniques isolées des patients et les souches de l'environnement ont probablement un pouvoir pathogène différent. En effet, les souches provenant de malades, et adaptées à la croissance dans l'intestin peuvent donner immédiatement une croissance en phase logarithmique, tandis que les souches venant de l'eau ou de milieux artificiels ont besoin d'un temps de latence pour la synthèse des enzymes inductibles. Les foyers épidémiques seraient de ce fait des foyers plus virulents (Urdaci-Bertran, 1987).

1.4.2. Structure antigénique et virulence

Actuellement, deux sérogroupes sont identifiés :

- le groupe *O1* qui agglutine l'antisérum O:1 comporte 3 sérotypes (Ogawa [AB(C)], Inaba [A(C)] et Hikojima [ABC]) et deux biotypes ("*classique*" et *El Tor*). Les sérotypes Ogawa et Inaba sont les plus fréquemment rencontrés dans les récentes épidémies ; *in vitro* il a été démontré une conversion possible entre les deux (Sakazaki et Balows, cité par Urdaci-Bertran, 1987). L'antigène O ou les antigènes spécifiques C et B sont des constituants du LPS de la membrane externe des bactéries.

- le groupe *non O1* qui n'agglutine pas le sérum polyvalent du groupe *O1* comporte quant à lui 72 sérotypes de pathogénicités différentes (dans Janda et al., 1988).

Toutes ces souches de *V. cholerae* ont un antigène flagellaire commun H qui est thermolabile (détruit à 100°C).

Jusqu'alors, *V. cholerae O1* était considéré comme l'agent direct du choléra et *V. cholerae non O1* comme l'agent de diarrhées quasi cholériques, mais l'apparition récente de mortalités au Bangladesh dues au groupe *non O1* remet en question ce postulat (Janda et al., 1988). Ces mortalités sont-elles dues à la bactérie ou alors à une surinfection de personnes déjà malades ? Aux USA les souches responsables de gastroentérites et décrites comme des *V. cholerae non O1* se sont révélées identiques à *O1* d'un point de vue biochimique et génétique.

Les travaux de Urdaci-Bertran (1987) sur la recherche du gène codant pour la toxine cholérique, montrent que l'espèce *V. mimicus* (voir *Introduction*) posséderait, non pas un gène identique, mais une fraction homologue du gène codant pour cette toxine. Cette homologie est-elle suffisante pour permettre l'expression du gène de la toxine chez *V. cholerae non O1* ?

De même, dans le cas des souches NAG-ST de *V. cholerae non O1*, peu représentées dans l'environnement mais très toxiques, Pal et al. (1992) se demandent si elles ne constituent pas des réservoirs de gènes codant pour la toxine dans le milieu.

L'identification précise est extrêmement difficile, car on détecte régulièrement de nouveaux groupes sérologiques, différant des précédents par un seul facteur antigénique ; nous connaissons par exemple le biosérogroupe 1875 [DB(C)] qui a des antigènes en commun avec *Ogawa* et *Inaba*, mais qui n'a pas, cependant, le facteur A commun à toutes les souches de *V. cholerae O1* (Shimada et al., 1987) ou encore le sérogroupe *Hakata* (FCD) qui a le facteur C de *Inaba* mais pas le facteur B de *Ogawa* (Shimada et Sakazaki, 1988) ; de même, il existe un problème taxonomique pour un sérotype habituellement classé dans l'espèce *Vibrio fluvialis*, dont l'antigène O n'est pas agglutiné par les antisérums de *Vibrio fluvialis* et qui possède le facteur C de *Inaba* (Shimada et al., 1987) etc..... Ces sérogroupe sont actuellement difficiles à classer dans les groupes *O1* ou *non O1*.

Nous avons également un aperçu des difficultés à identifier *V. cholerae* et *V. mimicus*. En effet, dans le cas d'isolements cliniques, ces deux espèces sont facilement séparées, mais dans les études écologiques, elles le sont difficilement car les souches saccharose (-) luminescentes de *V. cholerae* peuvent être confondues avec *V. mimicus* ; l'emploi des techniques d'hybridation ADN/ADN est alors nécessaire pour la distinction (Urdaci-Bertran, 1987)

1.4.3. Cas de *Vibrio cholerae O1*

Cette bactérie est la cause de nombreuses épidémies de choléra. Quelques remarques concernant les sérotypes et les biotypes en cause sont à souligner. Par exemple :

- à Hong Kong en 1964, il avait été observé une augmentation significative de *non O1* juste avant l'épidémie. La possibilité d'une mutation de *non O1* en *O1* dans des conditions favorables serait donc possible (Cabane, 1982).
- en Inde et au Bangladesh, le choléra est endémique et le sérotype incriminé est *Inaba* biotype *El Tor*, mais de récentes études ont montré la présence de plus en plus fréquente du biotype "*classique*" à côté du biotype *El Tor* dans les cas cliniques étudiés (Janda et al., 1988).
- au Pérou, dans toute l'Amérique latine et en Amérique du Nord, la récente épidémie de 1991 est due au sérotype *Inaba* biotype *El Tor* (Jones et al., 1992, Glass et al., 1992)
- aux USA, tous les cas de choléra concernent le sérotype *Inaba* biotype *El Tor* et les souches sont fortement hémolytiques (Janda et al., 1988).

Dans le monde jusqu'en 1960, c'était le biotype "*classique*" qui dominait. Actuellement on trouve le plus souvent le biotype *El Tor*.

Mais *V. cholerae* O1 est rencontré dans des pays tempérés sans manifestations cliniques apparentes. Ainsi en Australie, Eyles et Davey (1988) et en Angleterre, Lee et al. (1982), ont isolé des sérogroupes O1 *El Tor* qui ne produisaient pas de toxines. Certains d'entre eux avaient même persisté pendant cinq ans dans le milieu (rivières du Queensland). Beaucoup de bactériologistes pensent que ces souches O1 ont une niche écologique bien à elles et que celle-ci se trouverait dans les eaux saumâtres ; Lee et al. (1982) émettent l'hypothèse que la production de toxine ne serait pas nécessaire à leur survie dans ce milieu et qu'elle équivaldrait à une perte d'énergie inutile. Tamplin et Colwell (1986) ont montré quant à eux, une augmentation de la production de toxine avec la salinité (Fig. 6)

Dans l'habitat naturel, la sécrétion ou non de la toxine du choléra dans l'eau ou sur un hôte (zooplancton), reste une énigme. Si elle est sécrétée, sa fonction est toujours inconnue. Il est possible qu'elle permette un apport constant d'ions Na^+ à la bactérie pour sa respiration et pour d'autres processus métaboliques dépendant du Na^+ en provoquant une réponse spécifique du commensal, par exemple une libération des ions Cl^- , HCO_3^- et d'eau des cellules hôte et blocage de l'acquisition du Na^+ (Grimes, 1991). Les études de Tamplin et al. ont mis en évidence au moins quatre souches de *V. cholerae* qui produisent des inhibiteurs de la chaîne du Na^+ , dans doute reliés à cette toxine (Grimes, 1991). L'attachement de la bactérie au zooplancton dans le milieu est considéré comme un palier dans le processus de concentration vers l'épidémie (Huq et al., 1984) ainsi qu'une très bonne condition pour la survie puis la propagation. De plus la liaison particulière avec la chitine des copépodes permettrait de promouvoir la pathogénicité de *V. cholerae* O1 en protégeant les vibrios contre l'acidité gastrique du tractus digestif. Cette liaison permettrait à la dose infectieuse d'être moindre, pour un même volume d'eau (Tamplin et al., 1990).

La virulence de *V. cholerae* peut être modifiée par les plasmides : ainsi Hamood et al. ont montré que le facteur pVH2 augmentait la virulence tandis que le facteur de sexe P présent dans la souche de *V. cholerae* Inaba 569B inhibait la synthèse de la toxine cholérique (Urdaci-Bertran, 1987 ; Janda et al, 1988). D'autres plasmides peuvent réduire le taux de croissance. Quant aux facteurs R, de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, ils sont rares chez *V. cholerae* O1. Des plasmides de résistance à des antibiotiques présents chez *V. anguillarum* peuvent être transmis à *V. cholerae* (Urdaci-Bertran, 1987).

L'estimation de la dose infectieuse pour l'homme varie de 10^6 à 10^8 cellules bactériennes ; une activité gastrique plus faible (moindre acidité) semble réduire ce nombre à environ 10^4 cellules (Grimes, 1991).

La sensibilité de la bactérie aux acides a été exploitée pour adopter des mesures d'hygiène pendant l'épidémie au Pérou : Jones et al. (1992) ont montré une bonne sensibilité aux produits désinfectants usuels (acide peracétique, hypochlorite, ammonium quaternaire) mais néanmoins moins forte lorsque la bactérie est fixée sur des surfaces. De plus *V. cholerae* est très sensible à la dessiccation.

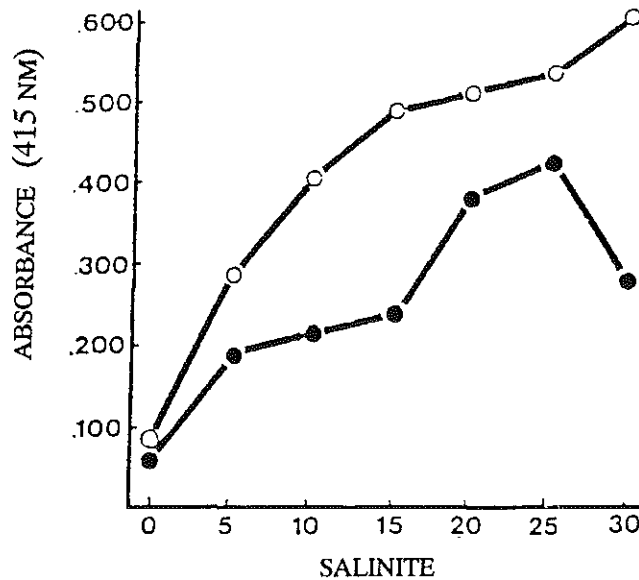


Figure 6. Effet de la salinité et de la concentration en éléments nutritifs organiques sur la production de toxine cholérique par *V. cholerae* 569B ("classique")

10 g/l d'éléments nutritifs ○ 1 g/l d'éléments nutritifs ●

(d'après Tamplin et Colwell, 1986)

1.4.4. Epidémiologie

L'épidémiologie de cette espèce est constamment en évolution. En 1978, *V. cholerae* *El Tor*, endémique en Asie du Sud Est s'est répandue dans huit nouveaux pays d'Afrique. En février 1991, elle est devenue endémique pour la première fois en Amérique du Sud, avec le Pérou comme point de départ : sa dissémination après introduction s'est faite par une contamination fécale des eaux de distribution dans le pays d'origine, une contamination de légumes dans un autre, par des coquillages dans un troisième etc.... et les voyages ont parfait cette dissémination jusqu'aux USA et jusqu'aux pays les plus reculés d'Amérique du Sud. L'épidémie ne cesse de s'étendre et la probabilité qu'elle devienne endémique dans cette partie du monde pendant des années est très forte, étant donné les conditions d'hygiène. Une endémie sera également favorisée par le fait que se sont constitués des réservoirs naturels à *V. cholerae* tels que le plancton, les coquillages, les oiseaux, l'eau et les hommes (Glass et al., 1992) (Fig. 7).

En plus de la dissémination, on observe d'un point de vue clinique, le remplacement de souches par d'autres dans certaines zones, par exemple celui du biotype *El Tor* par le biotype "classique" plus virulent au Bangladesh. De plus, il est mis en évidence des souches *O1* non toxigènes dans certains milieux saumâtres. Cela complique quelque peu la compréhension des phénomènes épidémiques.

Enfin, étant donné les problèmes de taxonomie liés à cette espèce, il est certain qu'il faut standardiser les méthodes actuellement disponibles pour une détermination précise des espèces en cause, et continuer les recherches pour définir si *V. cholerae O1* et *V. cholerae non O1* font ou non partie de deux groupes distincts.

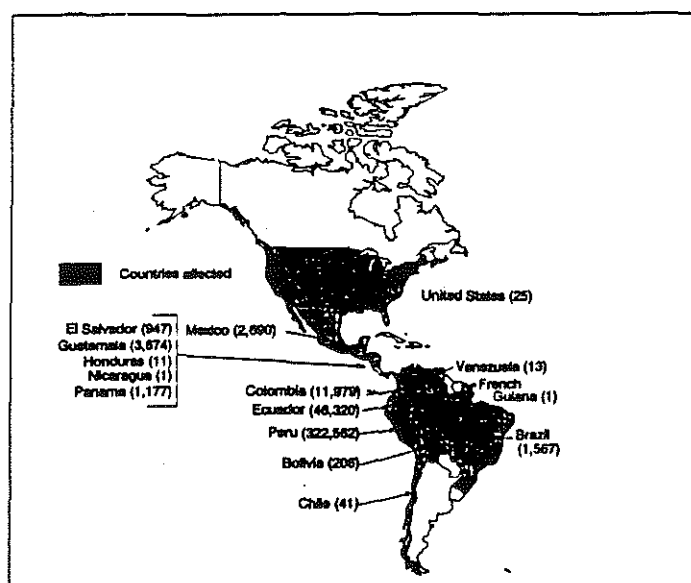


Figure 7. Cholera dans les Amériques. La carte indique le nombre de cas de cholera (par pays dans les deux Amériques) rapportés au Pan American Health Organization pendant l'année 1991. (Glass et al, 1992)

Il semble que de nombreuses zones côtières des USA soient des foyers endémiques pour la souche *non O1* : des infections humaines sont rapportées sur la côte, mais aussi à l'intérieur des terres. La virulence des souches *non O1* sur les patients est encore inexplicée (toxine cholérique, hémolysine, entérotoxine...). De plus, les bactéries isolées cliniquement ont souvent une virulence différente de celle observée sur les souches du milieu.

Les plasmides sont également un élément important de l'épidémiologie du fait qu'ils peuvent entraîner une résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et plus grave encore permettre un transfert d'une pathogénicité à des espèces bactériennes libres qui en étaient dépourvues.

Le stade de dormance dans lequel entrent les bactéries en attendant des conditions favorables pour se remultiplier est également important. D'une part les formes VNC non

détectées faussent les estimations réalisées, d'autre part ces formes peuvent perdre ou acquérir des propriétés de virulence (cf. plasmides).

Les agents du milieu mettant en contact l'homme et les bactéries sont les fruits de mer tels que crabes et huîtres qui concentrent *V. cholerae* via les copépodes ingérés par les animaux. Ces aliments consommés crus ainsi que des manipulations douteuses les concernant (après cuisson) vont permettre à la bactérie de s'installer et contaminer l'hôte ; ensuite il y a libération de la bactérie à partir de l'hôte (intestin humain) peut-être par action de la toxine cholérique (rejet dans les selles) et le vibrio peut alors être réintroduit dans le milieu avec les effluents domestiques. Oiseaux aquatiques, eaux potables, être humains contaminés, voyages, migrations ... sont autant de facteurs concourant à la dissémination de cette bactérie.

Conclusion

V. cholerae est donc une bactérie estuarienne des climats tempérés et tropicaux. En effet

– c'est une bactérie qui tolère des températures de 10 à 35°C – **préférendum : 21 à 28°C**

c'est une bactérie qui tolère des salinités de 0 à 37 g NaCl/l – **préférendum : < 5 g/l**

ce n'est pas une bactérie halophile car le NaCl n'est pas vital pour sa croissance.

– sa présence est conditionnée par la matière organique dissoute ainsi que le zooplancton et les particules minérales sur lesquels elle s'aggrège.

– elle a la capacité de passer au stade VNC, la température (8–10°C) étant le facteur de déclenchement, la revivification s'effectue ensuite lorsque la température atteint environ 17°C, et qu'il y a présence de matière organique dissoute et de zooplancton.

– elle est soumise à des échanges génétiques, surtout avec les *Enterobacteriaceae*.

– elle montre une affinité particulière, de type symbiotique avec les bivalves.

V. cholerae montre une sensibilité particulière aux pH acides.

Il n'est pas observé de corrélations entre la présence de *V. cholerae* et la pollution fécale dans les estuaires.

Chez *V. cholerae* O1, le plus virulent, la pathogénicité est surtout liée à la production d'une exotoxine (entérotoxine). De plus la virulence des souches du milieu est différente de celle des souches cliniques.

Actuellement d'importants problèmes de taxonomie existent et la distinction entre *V. cholerae* O1 et non O1 et leur pathogénicité respective n'est pas clarifiée.

2 – *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Introduction

V. parahaemolyticus peut être divisé en deux souches distinctes selon la présence ou non d'une hémolysine (celle-ci déterminerait en grand partie le pouvoir pathogène de la bactérie). Il s'agit des souches KP(+) et KP(-)

Dans certaines études, *V. parahaemolyticus* est souvent associé à *V. alginolyticus* dont il se rapproche beaucoup, bien que les auteurs ne soient pas tous d'accord sur leurs caractères biochimiques distinctifs. Les études d'hybridation ADN/ADN montrent que ces deux espèces sont reliées par 65% d'homologie (Douet, 1992)

Cette bactérie été répertorié dans diverses parties du monde, par exemple:

- au Japon, en Thaïlande et aux Philippines (Eyles, 1986) elle est la cause courante de gastroentérites. 30 % des intoxications alimentaires au Japon lui sont imputées : ceci s'explique par la préférence des Japonais pour le poisson cru et les fruits de mer.
- aux U.S.A. et en Australie, les infections sont moins fréquentes et la plupart du temps consécutives à des cuissons imparfaites des produits ou à une prolifération de bactéries déjà existantes lors de stockages inadéquats au froid (Joseph et al., 1982) ; elles sont également dues à la consommation d'huîtres crues (Janda et al., 1988).

V. parahaemolyticus est également rencontrée en zone tropicale près de Porto Rico (Rivera et al, 1989)

- en Europe, on la rencontre assez souvent, mais elle est très rarement associée à des intoxications alimentaires. En France, elle est également souvent identifiée mais n'est pas recherchée en analyses de routine car les cas cliniques recensés sont rares (trois analyses positives dans les selles de malades entre 1981 et 1983) (Douet, 1992).

Quant à *V. alginolyticus*, il provoquerait surtout des infections extra digestives

2.1. Distribution

La revue bibliographique de Joseph et al. (1982) permet de situer cette espèce dans le monde entier, en zone côtière et à l'embouchure des rivières : d'une part c'est une bactérie qui se défend mal contre la forte salinité, les basses températures, le faible taux de nutriments et la forte pression hydrostatique de l'océan, d'autre part, les marées contribuent à la ramener dans les zones hautes des estuaires. En Europe elle est surtout rencontrée dans les estuaires

atlantiques britanniques et français (Ortigosa et al., 1989). En milieu tropical, Rivera et al. (1989) l'ont trouvée uniquement dans les estuaires et les marais, jamais dans le sable marin.

D'un point de vue spatial, pendant la période d'abondance, les densités sont plus faibles dans les eaux de fond que dans les eaux de surface en baie de Narragansett, (côte Est des USA) (Watkins et Cabelli, 1985), tandis qu'en baie de Chesapeake (côte Est des USA), la bactérie est détectée dans toute la colonne d'eau, le plancton et le sédiment par Kaneko et Colwell (1978).

Elle fait partie de la microflore des estuaires, s'accroche au zooplancton, vit dans les poissons, les coquillages, les crabes et les crevettes (Colwell et al., 1984 ; Watkins et Cabelli, 1985 ; Eyles, 1986 ; Urdaci et al., 1988 ; Nair et al., 1991). Dans le Golfe du Mexique, on la trouve aussi dans les requins, dans 80% des goélands et 42% des pélicans. Elle est également associée à des blooms de dinoflagellés tels que les *Ptychodiscus brevis* : il est possible que son augmentation lors de ces blooms permette son retour sur les rivages via les aérosols (Buck, 1990).

2.1.1. Rôle de la matière organique

La matière organique dissoute ne supporte pas seule le développement des bactéries hétérotrophes. La matière particulaire comme le plancton et ses détritiques peut porter de grandes quantités de microorganismes mais ce paramètre pourtant important, ne suffit pas à expliquer la présence de *V. parahaemolyticus* dans les estuaires car la bactérie a été retrouvée associée au plancton dans des zones plus ouvertes (Kaneko et Colwell, 1978).

Watkins et Cabelli (1985) ont noté, eux aussi, une corrélation positive entre sa présence et le contenu zooplanctonique ainsi que le carbone organique dissous.

2.1.2. Relation avec la pollution fécale

De nombreux auteurs s'accordent à dire qu'il n'y a pas de relation entre la présence de la bactérie et la pollution fécale (Kaneko et Colwell, 1978 ; Rodrick et al., 1984 ; Sato et al., 1992)

D'autres auteurs avancent la théorie d'une relation entre la présence de cette bactérie et la pollution urbaine, avec le zooplancton pour intermédiaire. Ce dernier serait stimulé au sein de la chaîne alimentaire par la matière organique rejetée, et la bactérie se multiplierait à son contact. Des études en laboratoire confirment ce manque de relation directe (Watkins et Cabelli, 1985). Venkateswaran et al. (1989) avancent la même théorie assortie de l'observation suivante : la bactérie se rencontre également dans des zones où la pollution par les coliformes fécaux est nulle.

Les indicateurs traditionnels de pollution ne sont donc pas utilisables pour évaluer la probabilité de la présence de *V. parahaemolyticus*

Par contre, dans le milieu estuarien, des échanges peuvent avoir lieu entre les deux groupes bactériens : c'est le transfert de plasmides de l'une à l'autre, celui-ci permettant aux

bactéries autochtones d'acquérir des facteurs de résistance aux agressions (antibiotiques, métaux lourds) et/ou de modifier leurs facteurs de pathogénicité. En effet ces bactéries sont soumises à une forte compétition lorsqu'arrivent les bactéries entériques allochtones. Cet échange a été observé entre *E. coli* et *V. parahaemolyticus* (Colwell et al., 1984).

2.1.3. Rôle du zooplancton

En période d'abondance, 80% des bactéries hétérotrophes sont attachées au plancton ou à des particules. La dominance zooplanctonique est assurée par des copépodes, sur lesquels les bactéries s'adsorbent en association externe, processus favorisé par la salinité estuarienne (Kaneko et Colwell, 1978). Les capacités d'adsorption seraient différentes selon les souches de *V. parahaemolyticus* (Tomayosu, 1992).

Des études en laboratoire ont montré que l'adsorption se faisait sur la chitine des copépodes et que les chitinases étaient abondantes chez les vibrios. La chitine utilisée comme source de nourriture permet à la bactérie de proliférer (ceci n'est pas toujours observé dans le milieu à cause de la compétition au sein de la communauté planctonique par exemple avec des espèces toxiques). Ainsi des études *in vitro* montrent qu'une addition de zooplancton entier, ou de zooplancton refroidi (8h à 4°C) ou de chitine à de l'eau de mer filtrée, provoque une diminution de *V. parahaemolyticus* à l'état libre puis une multiplication très forte en 5 à 6 jours (Watkins et Cabelli, 1985 ; Pace et Chai, 1989). (Fig. 8)

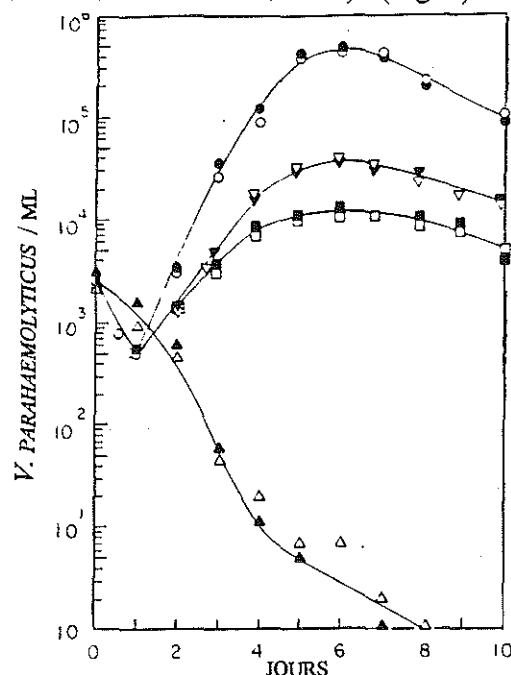


Figure 8. Effets du zooplancton, du zooplancton refroidi et de la chitine avec ou sans effluents secondaires, sur les densités de *V. parahaemolyticus* dans de l'eau de mer filtrée (S = 10 g/l).

chitine ● ,chitine + 1% effluents ○ ,zooplancton refroidi ▼ , zooplancton refroidi + 1% effluents ▽
zooplancton ■ , zooplancton + 1% effluents □ , témoin ▲ ,témoin (1% effluents)△

(d'après Watkins et Cabelli, 1985)

2.1.4. Rôle de la température et de la salinité

C'est une bactérie qui apprécie les eaux tempérées ; ainsi Kaneko et Colwell (1978) ne la détectent pas à température inférieure à 6°C, et considèrent que sa limite inférieure de multiplication est 10°C (même si en laboratoire certaines souches se sont multipliées à 5°C après une longue incubation). Elle est détectée jusqu'à des températures de 31°C.

A Chesapeake en zone tempérée-froide, de juin 1979 à août 1981, Colwell et al. (1984) la détectent pour des salinités variant de 8 à 20 g/l tandis qu'en zone tropicale, Rivera et al. (1989) la détectent pour des salinités de 20 à 35 g/l avec un optimum à 20 g/l. Mais elle peut supporter beaucoup moins si l'eau est riche en matière organique : $1,5 \cdot 10^5$ cellules par litre ont été dénombrées avec une salinité de 5g/l (Kaneko et Colwell, 1978). Le sel est indispensable à sa survie car récemment, des études ont montré qu'elle possédait une pompe à sodium, mécanisme permettant un transport des éléments nutritifs à travers la membrane cytoplasmique grâce au transfert d'électrons lui même dépendant du sodium (Bertrand et Larsen, 1989).

Une salinité intermédiaire semble favorable à cette bactérie.

Il est certain qu'il lui faut l'optimum conjugué des deux facteurs : une étude bibliographique de Grimes, (1991) met beaucoup d'auteurs en accord sur ces optima : 20°C et 20g/l.

2.1.5. Rôle de divers autres paramètres

Des corrélations positives ont été notées entre la présence de *V. parahaemolyticus* et le phosphore ainsi que les phosphates (Watkins et Cabelli, 1985 ; Rivera et al, 1989). Le taux de phosphates constitue sans doute un facteur limitant pour sa croissance dans les estuaires car il a été observé une activité accrue des phosphatases alcalines dans les cellules de bactéries issues de ces milieux. Siuda et Chrost (cité par Pace et Chai, 1989) ont montré que les phosphatases alcalines produites par cette bactérie étaient soit constitutives soit inductibles, et soutenaient la croissance des bactéries lorsque le taux de phosphates était faible dans le milieu Ces enzymes permettent la reconversion des phosphates organiques sous une forme utilisable par les bactéries.

De faibles corrélations positives sont également notées avec l'azote et le phytoplancton observations confirmées par des études *in vitro* avec le gel de silice et *Skeletonema costatum*, Une relation positive est également notée avec la lumière puisque celle-ci permet la photosynthèse donc un développement de phytoplancton, suivi par un développement de zooplancton (Watkins et Cabelli, 1985).

Un pH légèrement alcalin est plutôt favorable à sa croissance.

2.2. Cycle saisonnier et mécanisme de survie

2.2.1. Pays froids et tempérés

– de novembre à mars

Dans la baie de Chesapeake, lorsque la température est inférieure à 6°C, *V. parahaemolyticus* n'est détecté ni dans la colonne d'eau ni sur le plancton, par contre il existe en infimes quantités dans le sédiment (Kaneko et Colwell, 1978) ; dans la baie de Narragansett la température "limite" est 11°C (Watkins et Cabelli, 1985). On suppose qu'en deçà de ces températures la bactérie survit sans multiplication dans un état d'hibernation. Sa protection contre le froid dans les sédiments est peut-être assurée par les ions calcium et magnésium (Kaneko et Colwell, 1978) ou alors par les phosphatases alcalines qui seraient peut-être également impliquées dans ce processus, car on a constaté une forte diminution de l'ATP et des phospholipides totaux, de même fut observée une diminution du volume des cellules (Pace et Chai, 1989). La bactérie adopte alors le stade VNC (voir *Données générales*).

– d' avril à juin

L'action du vent entraîne une remise en suspension des bactéries à partir du sédiment, le lessivage des terres par les pluies printanières entraîne un développement de phytoplancton puis de zooplancton. Les bactéries s'accrochent à ce dernier (composé de copépodes essentiellement) puis prolifèrent grâce à la chitine. La température est alors d'environ 14°–16°C (Kaneko et Colwell, 1978 ; Urdaci–Bertran, 1987) cette époque de l'année, les agrégats concernent des copépodes adultes. La phase exponentielle de croissance suit de près le bloom de copépodes (Venkateswaran et al., 1989). A Arcachon, *V. parahaemolyticus* est détecté dans la colonne d' eau lorsque la température avoisine 12°C (Urdaci et al., 1988). La contamination des organismes marins s'effectuerait surtout par voie directe à partir de l'eau et des sédiments, sauf dans le cas du crabe (*Carcinus maenas*) pour lequel le transfert s'effectuerait par voie trophique (Gauthier et Clément dans Urdaci et al., 1988).

– de juillet à novembre

Le taux de *V. parahaemolyticus* est maximum dès que la température atteint 19–21°C. En pleine saison estivale la bactérie se trouve dans l'eau, le plancton et le sédiment, montrant de forts pics d'agrégats plancton–bactérie dans la colonne d'eau. A cette époque, les agrégats concernent des copépodes juvéniles et immatures. Pendant cette période, des actions mécaniques de l'eau provoquent la libération d'une partie des bactéries qui s'accrochent à de nouvelles cellules intactes et d'une autre partie qui retourne au sédiment pour s'impliquer dans

la minéralisation du plancton : ceci explique les comptages positifs dans les sédiments (Kaneko et Colwell, 1978 ; Watkins et Cabelli, 1985).

Ce cycle peut varier légèrement, en fonction des températures saisonnières.

Il est nettement moins marqué en Europe.

Au Japon, Venkateswaran et al.(1989) ont observé deux cycles : l'un en zone non polluée où la présence de *V. parahaemolyticus* est dépendante de la température (cycle analogue au précédent), l'autre en zone très polluée où la présence de la bactérie en agrégats est quasiment constante (moindre en mars-avril) et manifestement indépendante de la température.

D'un point de vue écologique, *V. parahaemolyticus* est passionnante surtout dans son rôle de décomposition et de régénération de la matière organique des couches superficielles du sédiment. Son apparition est apparemment liée à plusieurs paramètres biotiques ou abiotiques (Venkateswaran et al, 1990) dont deux essentiels : la température et/ou la matière organique.

Sa survie est assurée par divers réservoirs naturels (crustacés, mollusques, poissons, oiseaux) et par sa capacité à rester viable et même active dans des conditions d'anaérobiose (Younggreen-Grimes et al., 1988).

(voir Fig. 9, 10, et 11)

2.2.2. Pays tropicaux

En pays tropical, le cycle est différent et fortement lié à la salinité : en Afrique de l'Ouest et à Porto Rico, la fréquence d'apparition de *V. parahaemolyticus* est la plus haute en saison sèche avec une salinité de 15 à 21 g/l et la plus basse en saison humide avec une salinité de 1 à 4 g/l (Rivera et al., 1989) ; par contre au Vietnam, on observe le phénomène inverse (Joseph et al., 1982).

Le paramètre température joue également un rôle important puisqu'il permet une multiplication et une survie très fortes de la bactérie. (Rivera et al, 1989).

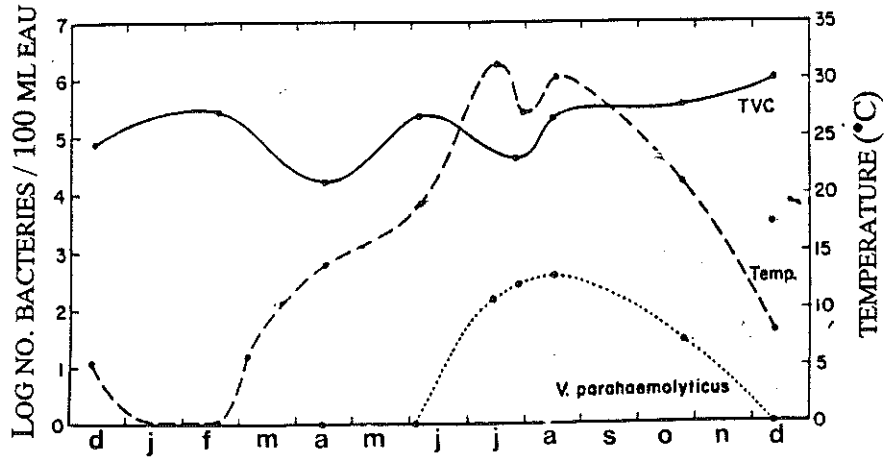


Figure 9. Distribution, par saison, des bactéries hétérotrophes totales et viables (TVC) et de *V. parahaemolyticus* dans l'eau (par 100 ml) récoltée dans la Rhode River. (d'après Kaneko et Colwell, 1978)

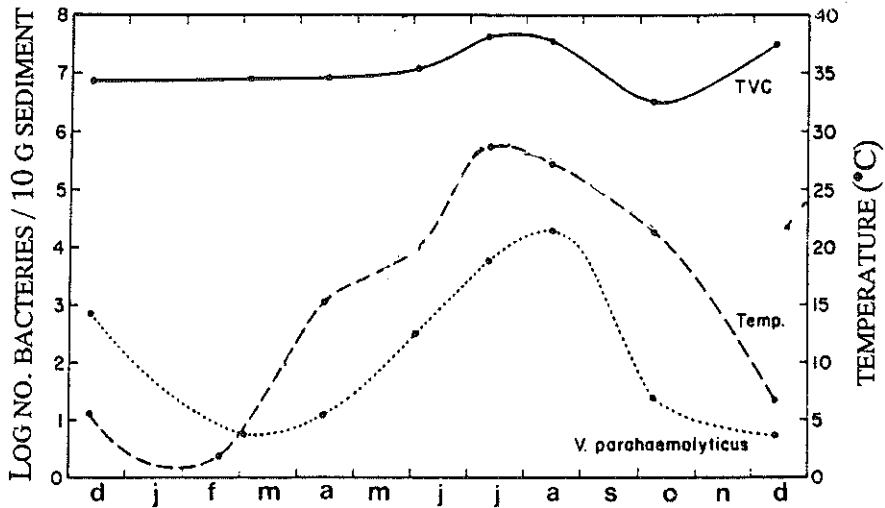


Figure 10. Changement saisonnier dans la population des bactéries hétérotrophes totales et viables (TVC) et de *V. parahaemolyticus* dans le sédiment (par 10 g) dans la Rhode River. (d'après Kaneko et Colwell, 1978).

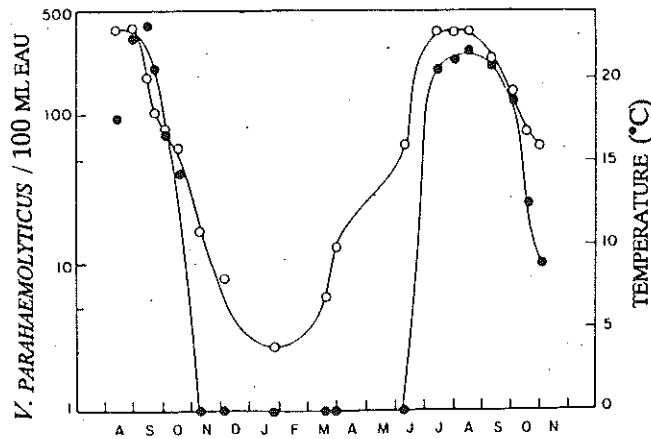


Figure 11. Effet de la température de l'eau sur l'incidence de *V. parahaemolyticus*. (d'après Watkins et Cabelli, 1985)

2.3. Caractères physiques et biochimiques

Les caractères physiques et biochimiques de *V. parahaemolyticus* sont les suivants :

gram (-) – mobile – taille : 0,5 à 0,8 µm de large 1,4 – 2,6 µm de long

élaboration de flagelles latéraux sur milieu solide

croissance à 43°C

oxydase (+)

catalase (+)

réduction des nitrates en nitrites (+)

indole (+)

Voges Proskauer (-)

βgalactosidase (-)

lysine décarboxylase (+) (certaines souches seraient lysine décarboxylase(-))

ornithine décarboxylase (+)

arginine dihydrolase (-)

gélatine liquéfiée

uréase (-) pour la plupart

mannitol (+)

utilisation du D. glucose (+), saccharose (-), lactose (-), L arabinose (+) amidon (+)

production de gaz à partir du glucose : (-)

rouge méthyl (+)

croissance sur milieu à 3%, 6% et 8% NaCl, pas de croissance sur milieu à 0% et 10% NaCl,

certaines souches atypiques sont capables de croître sur milieu à 10%NaCl (Urdaci-Bertran,1987)

pas de bioluminescence

sensibilité au facteur vibriostatique O/129.

(Baumann et al.,1984 ; Janda et al., 1988)

N.B. Pour un complément d'identification voir en *Annexe 2*.

2.4. Pathogénicité

2.4.1. Mode d'action des toxines et autres facteurs de virulence (Cabane, 1982 ; Joseph et al., 1982 ; Janda et al., 1988 ; Rodrick, 1991 ; Douet, 1992)

Le mécanisme de pathogénicité a été bien étudié mais reste cependant encore obscur. On pense qu'il y a mise en jeu de plusieurs mécanismes pathogènes consécutifs ou indépendants :

– lorsque la bactérie atteint le tractus digestif, elle se multiplie et sécrète une enzyme, la mucinase, qui digère l'enveloppe de mucus protégeant la muqueuse intestinale. Ensuite, il y a libération d'une hémolysine de nature protéique qui s'attaque aux tissus : action sur la perméabilité vasculaire, lyse des cellules intestinales et accumulation des fluides (électrolytes et eau) à l'intérieur du tractus digestif.

Selon les souches de *V. parahaemolyticus*, il a été décrit plusieurs hémolysines : une hémolysine thermostable (TDH) liée au phénomène Kanagawa, cytotoxique et cardiotoxique (voir 2.4.3.), et deux autres hémolysines, l'une thermostable, l'autre thermolabile dont le pouvoir pathogène n'a jamais encore été mis en évidence (Douet, 1992).

– ensuite il y a invasion des cellules intestinales par d'autres facteurs de virulence comme des enzymes : les phospholipases, les lysophospholipases et les glycérophosphorylcholine diestérases, dont le rôle dans la virulence n'est pas encore bien défini.

D'autres toxines peuvent être synthétisées : par exemple, des Shiga-toxines (toxines de *Shigella dysenteriae*) jouant un rôle dans les diarrhées sanglantes, ou encore des toxines LT et ST d'*Escherichia coli*

L'adhérence entre la bactérie et les cellules muqueuses est nécessaire et constitue sans doute un maillon très important du processus de pathogénie. Cette adhérence est possible grâce aux flagelles latéraux permettant de se diriger rapidement, aux pili qui ont un rôle dans l'agglutination des globules rouges et à une autre adhésine qui est le glycocalyx (recouvre la membrane externe des gram(-)) (Douet, 1992).

2.4.2. Structure antigénique et virulence :

V. parahaemolyticus comporte différents sérotypes regroupés d'après leurs antigènes. Il a été dénombré :

– 12 antigènes O : ceux-ci sont thermostables. Leurs spécificités antigéniques sont liés à la présence ou non de sucres (arabinose, mannose, rhamnose et xylose).

– 65 antigènes capsulaires K : ceux-ci sont thermolabiles. La composition en sucre de K varie beaucoup selon le type sérologique. Des communautés antigéniques K existent entre *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*

– l'antigène flagellaire H qui est commun à toutes les souches et qui peut se diviser en deux types : le flagelle polaire monotriche (M) et les flagelles latéraux (L). *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* possèdent le même antigène L. (Urdaci-Bertran, 1987 ; Joseph et al., 1982).

Il n'y aurait pas de relations entre la virulence d'une souche et l'antigène capsulaire K. Les variations annuelles des types capsulaires mis en évidence sur des patients l'attestent. En

corollaire, il est certain que la fréquence d'apparition des différents sérotypes varie avec le temps et le lieu (dans Cabane, 1982), ceci est dû à la nature extrêmement changeante du milieu estuarien dans lequel apparaissent spontanément de nouvelles formes capsulaires.

De nombreuses études ont montré que les sérotypes isolés à partir des selles des patients n'étaient généralement pas ceux retrouvés dans les aliments qu'ils avaient ingérés (Tomayosu, 1992).

2.4.3. Phénomène Kanagawa

C'est un phénomène qui décrit la faculté de souches bactériennes de *V. parahaemolyticus* à hémolyser les érythrocytes humains sur gelose Wagatsuma (voir *Annexe I*). Il y a mise en jeu de deux souches qui se distinguent par leur production plus ou moins importante d'hémolysine – l'une trouvée en grand nombre dans l'environnement est généralement considérée comme non pathogène, c'est la souche KP(-). Elle possède l'hémolysine thermolabile.

– l'autre plus rare, est infectieuse, c'est la souche KP(+) qui est très souvent isolée dans des cas cliniques. Elle possède l'hémolysine thermostable TDH et quelquefois l'hémolysine thermolabile (Joseph et al., 1982 ; Douet, 1992).

Pace et Chai (1989) ont cherché à déterminer des différences dans la composition de l'enveloppe cellulaire des deux souches, ceci dans une eau estuarienne (voir Tab. 2). Ils ont également formulé des observations concernant la croissance :

- * l'addition de chitine améliore la croissance des deux souches
- * lors de la phase exponentielle de croissance, les KP(+) se développent de manière plus performante que les KP(-).

Ces mêmes auteurs ont observé que la baisse rapide de croissance constatée après la phase stationnaire, liée à une densité optique quasiment équivalente montre les deux faits suivants : les KP(+) abordent un stade non cultivable et il n'y a pas lyse des cellules, c'est le stade VNC. Ceci est confirmé par les valeurs d'ADN qui sont toujours importantes et l'observation d'une diminution de la taille des cellules. Ce stade VNC adopté par les KP(+) en période de privation laisse préjuger une forte présence de souches pathogènes non détectées. De plus, l'observation suivante a été faite : des souches KP(-) devenaient KP(+) sur milieu d'isolement si l'on prolonge la durée d'incubation au delà de 18 à 24h ou encore si l'on substitue d'autres glucides au mannitol (Chun et al. cité par Douet, 1992). Cette observation a été confirmée lors d'une épidémie de gastroentérites au Japon : en effet, les sérotypes O et K isolés du milieu marin ne correspondaient pas à ceux des souches KP(-) isolées juste avant et juste après l'épidémie, de plus curieusement, aucune souche KP(-) n'avait été isolée dans le milieu pendant l'épidémie. Effectivement, en général les cas cliniques sont constitués de 95%

de KP(+) alors que l'on trouve 99% de KP(-) dans le milieu aquatique : y a-t-il sélection des unes dans l'intestin humain et sélection des autres dans le milieu marin ?

Tableau 2 : Différences biochimiques observées entre les souches KP(-) et KP(+)
(d'après Pace et Chai, 1989)

	KP (-)	KP (+)
Contenu protéinique (valeur moyenne)	61.5 ± 3.1%	45.2 ± 3.2%
Contenu phospholipidique (valeur moyenne)	19.2 ± 6.4%	46.6 ± 2.3%
Lipposaccharides totaux (valeur moyenne)	19.3 ± 4.9%	8.2 ± 2.7%
Phosphatase alcaline (activité moyenne)	légèrement supérieure	légèrement inférieure
Chitinase (activité moyenne)	similaire	similaire
Spectre des protéines dominantes	6 à 12	1 à 4

La non pathogénicité des souches KP(-) est actuellement remise en question puisqu'il a été isolé douze souches différentes de KP(-) dans une manifestation de gastroentérites aux Maldives en 1985 (Janda et al., 1988).

Le caractère hémolytique (hémolysine thermostable) joue certainement un grand rôle dans la pathogénicité de *V. parahaemolyticus* et plus précisément dans l'entéropathogénicité (Nishibuchi et al. cité par Douet, 1992). Mais l'étude effectuée par ce dernier montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le pouvoir pathogène de l'espèce et le KP.

Le mécanisme de pathogénicité reste encore mal connu, mais il est sans doute lié à la composition de l'enveloppe cellulaire : celle-ci doit varier suivant les souches bactériennes et les conditions du milieu. Des sondes à ADN correspondant à la partie codant pour l'hémolysine thermostable devraient clarifier ce problème de virulence.

La dose infectieuse nécessaire pour provoquer une gastroentérite est à peu près connue : elle est de 10^6 cellules (Sahazaki dans Janda et al., 1988).

Seules les souches KP(+) peuvent héberger des plasmides (Arai et al. cité par Urdaci-Bertran, 1987)

N.B. Pour de plus amples informations sur le pouvoir pathogène de *V. parahaemolyticus* le lecteur est renvoyé à la publication de Janda et al. (1988) et la thèse de Douet, (1992)

2.4.4. Epidémiologie

Grimes (1991) souligne que le nombre de gastroentérites répertoriées aux USA est très faible étant donné l'ubiquité de l'espèce. Les cas sont-ils tous signalés dans un pays où les maladies sont très nombreuses ? Il n'y a pas d'épidémies, mais de plus en plus de cas depuis 10 ans (Rodrick, 1991). On constate aussi que des souches européennes de *V. parahaemolyticus* identiques aux japonaises, ne provoquent pas d'épidémie en Europe (Cabane, 1982).

L'épidémiologie est fortement conditionnée par le milieu estuarien, lequel du fait de sa mobilité extrême, permet à des souches virulentes de se révéler. De plus, Dodin et al. (communication personnelle) ont constaté que certains transferts génétiques pouvaient conduire *V. parahaemolyticus* à synthétiser la toxine cholérique (Douet, 1992).

Toutefois il est maintenant clair que les vecteurs de dissémination sont l'eau de mer et surtout les produits de la mer, crus, mal cuits ou mal réfrigérés après cuisson. Les animaux constituent eux aussi un réservoir naturel important : crabes, poissons, oiseaux aquatiques, très propices à la dissémination.

Cette dissémination peut provoquer des changements fondamentaux pour l'identification des souches. La variation de virulence très grande d'une souche à l'autre et d'un milieu à un autre (environnement ==> homme) montre la difficulté d'appréhender l'épidémiologie de l'espèce et la signification d'éventuels isollements à partir de l'environnement. On s'est aperçu aussi malheureusement que dans les très nombreuses études effectuées, ces microorganismes n'avaient pas toujours été bien distingués des autres vibrios : par exemple, on sait maintenant que les caractères saccharose (-) et la capacité à croître à 40-43°C, considérés auparavant comme des caractères typiques de *V. parahaemolyticus*, sont partagés par les espèces *V. vulnificus*, *V. proteolyticus* et certaines souches de *V. harveyi* (Baumann et al, 1984).

Conclusion

V. parahaemolyticus est donc une bactérie estuarienne des climats tempérés et tropicaux.
En effet :

- c'est une bactérie qui tolère des températures de 6 à 31°C – **préférendum : 20°C**
- c'est une bactérie qui tolère des salinités de 5 à 35 g NaCl/l – **préférendum : 20 g/l**
- c'est une bactérie halophile, avec le NaCl vital pour sa croissance.

- sa présence est conditionnée par la matière organique dissoute et le zooplancton sur lequel elle s'aggrège.
- le phosphore serait un facteur limitant pour sa croissance dans les estuaires.
- elle a la capacité de passer au stade VNC, la température (6–10°C) étant le facteur de déclenchement, la revivification s'effectue ensuite lorsque la température atteint environ 14°C, et qu'il y a présence de matière organique dissoute et de zooplancton.
- elle est soumise à des échanges génétiques, surtout avec les *Enterobacteriaceae*
- elle montre une affinité particulière, de type symbiotique, avec les bivalves.

Il n'est pas observé de corrélations entre la présence de *V. parahaemolyticus* et la pollution fécale dans les estuaires.

Chez *V. parahaemolyticus* KP(+), le plus virulent, le pouvoir pathogène est lié surtout à la production d'une hémolysine. La virulence des souches du milieu est différente de celle des souches cliniques.

La pathogénicité des souches pose encore de nouveaux problèmes, car la distinction entre les KP(+) virulents et les KP(-) non virulents, n'est plus une évidence actuellement.

3 - *VIBRIO VULNIFICUS*

Introduction

C'est une bactérie découverte plus récemment et décrite comme une "lactose positive" en 1976 (Grimes, 1991). On la retrouve plutôt dans les eaux estuariennes.

Elle est divisée en deux types morphologiques (Groubert et Oliver, 1992) :

- * variété opaque capsulée
- * variété translucide non capsulée

Elle est liée surtout à des cas de septicémie première et à des cas de surinfections de blessures. La plupart des cas de septicémies a lieu chez des hommes âgés de plus de 40 ans. Elle est dangereuse pour des personnes déjà malades (par ex. du foie ou atteintes de leucémie) et immuno dépressives (Buck, 1990 ; Groubert et Oliver, 1992).

– aux USA, elle est décrite du Maine à Washington par Kelly (1982), Oliver (1982), O'Neill et al. (1991) et Jones et al. (1992). Plus de 95% des décès consécutifs à l'ingestion de produits de la mer seraient causés par *V. vulnificus* selon Murphy et Oliver (1992).

– en Australie, elle est susceptible de causer parfois des infections entériques (Eyles, 1986).

– en Europe des infections sont répertoriées en Belgique (Rodrick, 1991). En France, un cas clinique grave a été décrit par Bebear et al. (1982) et elle a été identifiée plusieurs fois en Méditerranée.

Elle n'est jamais vraiment (et uniquement) impliquée dans des maladies diarrhéiques.

3.1. *Distribution*

V. vulnificus est couramment rencontrée dans les eaux estuariennes des climats tempérés et dans les mangroves d'estuaires tropicaux (sa niche y semble bien distincte de celle de *V. parahaemolyticus*) (Rivera et al, 1989).

Sa niche précise n'a pas encore été bien déterminée (Grimes, 1991) mais elle est détectée dans la colonne d'eau, le sédiment, les végétaux ainsi que dans les crabes et les huîtres (O'Neill et al, 1991, Rodrick, 1991). Plusieurs auteurs pensent que sa relation avec les bivalves est très étroite, de type commensale, et qu'elle est sous la dépendance directe de la température, de la salinité et de la matière particulaire.

Cette bactérie ayant été identifiée beaucoup plus récemment que les deux précédentes, seuls ses préférendums de température et de salinité sont à peu près définis :

– cette espèce apprécie les eaux plutôt chaudes, supérieures à 20°C (Vanoy et al, 1992) avec un optimum à 28°C (Tamplin et al, 1982 ; Kelly et Dinuzzo, 1985 et Rivera et al., 1989). Cependant on peut la détecter dans des eaux de 10 à 35°C (Tamplin et al, 1982 ; Oliver et al., 1983 ; Kaysner et al., 1987 et O'Neill et al., 1991) ; Tamplin et Capers estiment qu'elle ne se multiplie pas en dessous de 15°C. *In vitro*, l'optimum trouvé par Kelly (1982) serait 37°C.

– l'optimum de salinité se situe entre 10 et 16 g/l (Kelly et Dinuzzo, 1985 et Rivera et al., 1989). Cependant, on peut la détecter dans des eaux de 0,8 à 34 g/l (Kaysner et al., 1987 et O'Neill et al., 1991). *In vitro*, l'optimum trouvé par Kelly (1982) serait 20 g/l.

Cette bactérie a besoin d'un optimum conjugués de ces deux paramètres : températures chaudes et salinités assez faibles.

Quelques autres paramètres d'environnement permettent de mieux définir sa niche écologique, en particulier :

- la pollution fécale qui n'est pas liée à la présence de la bactérie (Tamplin et al., 1982 ; Rodrick et al., 1984 ; Rivera et al., 1989 et O'Neill et al., 1992)
- le phosphore et les phosphates pour lesquels des corrélations négatives sont observées (Rivera et al., 1989) ainsi que pour le pH lorsque celui-ci est compris entre 7,2 et 7,9.
- le pH optimum requis est légèrement alcalin

3.2. Cycle saisonnier et mécanisme de survie

Son cycle annuel est bien marqué et fortement dépendant de la température :

– période hivernale

En général la bactérie n'est plus détectée dès que la température est inférieure à 10–15°C et la salinité inférieure à 5 g/l : d' octobre à avril *V. vulnificus* n'est plus retrouvé dans les échantillons, sauf en concentrations extrêmement faibles dans ceux – matière en suspension, sédiment, eau et huître – prélevés en baie de Galveston (Floride, USA) (Vanoy et al., 1992) En effet, lorsque la température atteint des valeurs critiques, la bactérie entre dans le stade VNC (voir *Données générales*).

Wolf et Oliver, (1992) ont montré dans leurs études *in vitro* qu'en fait la température clé était 5°C : à cette température *V. vulnificus* devient noncultivable en 40 jours ; par contre, d'autres vibrios (entre autres *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*) restent cultivables (Fig. 12). A 10, 15, 20 et 30°C, il n'est pas constaté de différences d'aptitude de *V. vulnificus* à être cultivé.

Cette mise au repos à la température de 5°C n'est pas liée à une carence en éléments nutritifs, car le stade VNC a été atteint en laboratoire dans des milieux riches en nutriments.

Pendant cette période, le taux de composés lipidiques principaux des bactéries est affaibli (jusqu'à 12% en moins) mais elles conservent leur pouvoir de virulence (Wolf et Oliver, 1992)

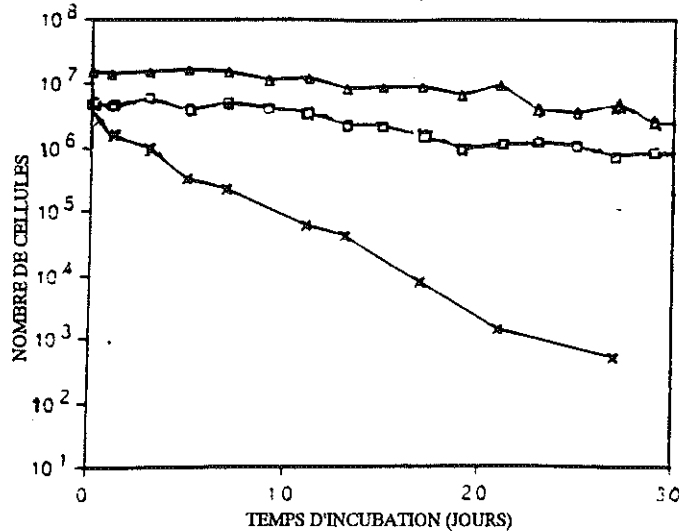


Figure 12. Réponse de divers *Vibrio* spp. à l'incubation à 5°C. Les souches pathogènes pour l'homme sont : *V. cholerae* □ *V. parahaemolyticus* △ et *V. vulnificus* (non cultivable en 40 jours) × (d'après Wolf et Oliver, 1992).

- période estivale

Du Nord au Sud de la côte Est des Etats Unis, sa période d'apparition dans le milieu se situe entre avril et octobre et cela correspond bien aux cas cliniques recensés. L'étude de Vanoy et al. (1992) en baie de Galveston (Floride) montre que la bactérie tend à réapparaître lorsque la température avoisine les 20°C et que la salinité est inférieure à 16 g/l (20°C et 16 g/l pour O'Neill et al., 1992). Les comptages sont les plus forts dans la matière en suspension, puis dans le sédiment, puis dans les huîtres et enfin dans l'eau. Sa multiplication suit de près les fortes pluies printanières car celles-ci induisent d'abord le bloom de phytoplancton puis celui de zooplancton, lequel est colonisé par les bactéries en avril-mai. Les pics d'apparition se situeraient en juillet-août pour O'Neill et al. (1992), en septembre pour Kelly (1982) (Fig 13) et en juillet et novembre pour Tamplin et al. (1982).

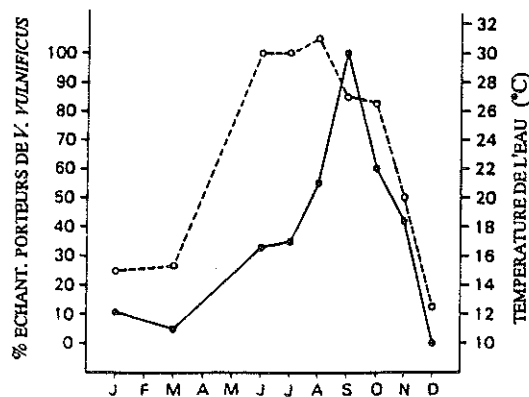


Figure 13. Variations saisonnières dans l'apparition de *V. vulnificus* (21 échantillons mensuels) *V. vulnificus* ●, température de l'eau ○ (d'après Kelly, 1982)

3.3. Caractère physiques et biochimiques

Les caractères physiques et biochimiques de *V. vulnificus* sont les suivants :

- gram (-), mobile, taille : 0,5 μ à 0,8 μ de large et 1,4 μ à 2,6 μ de long
- croissance à 43°C
- oxydase (+)
- réduction des nitrates en nitrites (+)
- indole (+) et parfois indole(-) (Bebear et al. 1982)
- Voges-Proskauer (-)
- β galactosidase (+)
- lysine décarboxylase (+)
- ornithine décarboxylase (+) pour la plupart
- arginine dihydrolase (-)
- uréase (-)
- utilisation du D. glucose (+), saccharose (-) ou (+), lactose (+), L arabinose (-)
(quelques souches sont lactose (-) : caractère acquis par mutation)
- production de gaz à partir du glucose : (-)
- croissance sur milieu à 3% et 6% NaCl, pas de croissance sur milieu à 0%, 8% et 10% NaCl
- pas de bioluminescence
- sensibilité au facteur vibriostatique O/129
(Baumann et al. 1984 ; Janda et al. 1988).

N.B. Pour un complément d' identification voir en *Annexe 2*.

Le caractère saccharose a été étudié dans le milieu : ainsi, Rivera et al. (1989) ont observé que les densités et les proportions de *Vibrio spp.* saccharose (-) étaient inversement reliées à la salinité de manière très significative ; ils ont fait la même observation pour les densités de *V. vulnificus* et les densités de bactéries [saccharose (-) β galactosidase (+)]. Ils suggèrent que la fréquence d'espèces β galactosidase (+) parmi les vibrios saccharose (-) puisse servir d'indicateur de la présence de *V. vulnificus* dans le milieu.

Tout comme Oliver et al, (1983), Rivera et al, (1989) ont trouvé que *V. vulnificus* représentait 20% de tous les vibrios lactose (+) saccharose (-) rencontrés dans le milieu.

3.4. Pathogénicité

3.4.1. Mode d'action des toxines et autres facteurs de virulence (Janda et al., 1988 ; Rodrick, 1991 ; Grimes, 1991)

Un facteur de virulence extracellulaire a été identifié : c'est la cytolyse LT (exotoxine), qui, associée à d'autres facteurs peut être la cause de la lyse des cellules, de la destruction des

tissus et de l'accumulation des fluides (électrolytes et eau). Elle peut envahir le corps humain à partir du tractus gastrointestinal et provoquer une septicémie. C'est une toxine très puissante, dont l'effet sur les animaux marins n'est pas encore bien connu.

V. vulnificus possède également des enzymes qui sont lipolytiques, protéolytiques et chitinolytiques : ce sont les phospholipases, les collagénases, les protéases, les chitinases. Elle possède également des protéines de transport, les sidérophores.

Enfin, elle possède des facteurs associés aux cellules tels que les polysaccharides de surface qui ont une fonction antiphagocytaire et une fonction de résistance à l'activité bactéricide du sérum humain (leucocytes et macrophages).

3.4.2. Structure antigénique et virulence

Shimada et Sakazaki (1984) ont déterminé 7 groupes, différant par leur antigène O. Ces groupes possèdent l'antigène H en commun.

V. vulnificus apparaît sous deux formes : l'une opaque et encapsulée qui est la forme virulente, l'autre translucide et non encapsulée qui est la forme non virulente. La différence d'opacité observée sur les colonies est due à la présence du polysaccharide, qui se trouve à la surface de la cellule et dont la virulence a été attestée par plusieurs chercheurs.

3.4.3. Epidémiologie

Le plus grand nombre de symptômes répertoriés se trouve aux Etats Unis : 16 états au moins sont touchés (Rodrick, 1991). Une étude rétrospective effectuée en Floride entre 1981 et 1987 révèle que les patients souffrant de surinfections avaient eu un contact plutôt avec l'eau de mer, alors que ceux souffrant de septicémies avaient plutôt ingéré des huîtres crues (dans Rodrick, 1991). L'étude des symptômes de l'ensemble des cas cliniques étudiés montre une absence de vomissements et de diarrhées (Joseph et al., 1982). Contrairement aux autres vibrios halophiles comme *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*, la virulence des souches du milieu marin n'est pas différente de celles isolées des cas cliniques : bien que certaines souches du milieu marin puissent produire des colonies opaques ou translucides, elles possèdent les mêmes cytolytines et autres facteurs de virulence que les souches cliniques.

L'identification des souches est très difficile car la souche opaque peut produire spontanément des souches translucides (Groubert et Oliver, 1992)

La dose infectieuse n'est pas encore bien connue, cependant une dose de 10^8 UFC (Unités Formant Colonie), souches cliniques ou environnementales, s'est révélée létale pour des souris (Kaysner et al, 1987).

L'entrée de la bactérie dans un stade viable non cultivable fausse également les estimations dans le milieu. De plus, si l'on considère que 5°C est la température de réfrigération normale et qu'à cette température, la bactérie peut entrer dans l'état de dormance, le contrôle de la présence de *V. vulnificus* dans les denrées finies sous-estimera lui aussi le nombre réel de cellules présentes (Wolf et Oliver, 1992). D'un autre côté des essais de maintien à températures variables d'huîtres contaminées, ont montré qu'aux plus hautes températures, le nombre de cellules de *V. vulnificus* diminuait avec le temps : les hautes températures ne jouent donc pas un rôle important dans la dissémination de la bactérie (Murphy et Oliver, 1992).

Conclusion

V. vulnificus est une bactérie estuarienne des climats tempérés et tropicaux. En effet :

– c'est une bactérie qui tolère des températures de 10 à 35°C – **préférendum : 28°C**

c'est une bactérie qui tolère des salinités de ^{28, 34}10 à 16g NaCl/l – **préférendum : 10–16g/l**

c'est une bactérie halophile, avec le NaCl vital pour sa croissance.

– sa présence est conditionnée par le zooplancton présent dans le milieu.

– elle a la capacité de passer au stade VNC, la température (10°C environ) étant le facteur de déclenchement, la revivification s'effectue ensuite lorsque la température atteint 20°C et qu'il y a du zooplancton.

– elle montre une affinité particulière, de type symbiotique, avec les bivalves.

Il n'est pas observé de corrélations entre la présence de *V. vulnificus* et la pollution fécale dans les estuaires.

Le pouvoir pathogène de la forme encapsulée est lié à la production d'une exotoxine (cytolysine). La virulence des souches naturelles est la même que celle des souches cliniques.

4 - VIBRIOS ET BIVALVES

4.1. Problématique en Europe

4.1.1. Généralités

En France, l'occupation de l'espace côtier par les élevages et les gisements naturels de coquillages, a conduit les chercheurs à s'intéresser au genre *Vibrio*, du fait de son impact éventuel sur l'homme, mais aussi sur les cheptels.

La caractère pathogène de ces bactéries pour l'homme a été décrit dans les chapitres précédents. *V. parahaemolyticus* est l'espèce la plus fréquente sur nos côtes.

La menace concernant les cheptels est souvent évoquée dans la littérature car plusieurs espèces de vibrios sont pathogènes pour les coquillages, dont certains non encore identifiés. Le plus connu est *V. anguillarum* qui s'attaque aux larves d'huîtres en éclosion (Tubiash, 1974) mais aussi aux adultes de *Crassostrea gigas*, d'*Ostrea edulis* et de *Mytilus edulis* (Birbeck et al., 1987 ; Bolinches et al., 1986). Des études taxonomiques effectuées par Ortigosa et al. (1989) révèlent que l'on peut trouver jusqu'à 10^5 vibrios par gramme de moule et de plus une grande diversité d'espèces dans les moules d'écloseries (un peu moins dans les moules commercialisables). *V. parahaemolyticus* n'est retrouvé dans les écloseries qu'à température élevée.

Brown et Tettelbach (1988) ont identifié également un autre vibrio s'attaquant aux larves de clams et d'huîtres : c'est le *Vibrio sp.* très proche de *V. anguillarum*.

On connaît également le *Vibrio P1* parasite des larves et adultes de *Ruditapes philippinarum*, responsable de la maladie de "l'anneau brun".

4.1.2. Zones d'élevage

En Rade de Brest, à la suite de mortalités hivernales massives de palourdes *Ruditapes philippinarum*, Prieur et al, (1985) ont effectué une étude bactériologique *in situ* sur 18 espèces de bivalves, incluant des analyses d'eau de surface, d'eau de fond et de sédiment. Les coquillages possédaient en général une microflore riche en vibrios, ceux-ci se trouvant en quantité toujours plus importante que dans l'eau de mer ; cependant, ils n'ont jamais pu constater de modifications des peuplements bactériens juste avant les mortalités. Par contre une augmentation fut notée après ces mortalités : celle-ci correspondrait à une phase de dégradation des tissus lésés plutôt qu'à une pathologie. C'est une invasion secondaire.

Dans le Bassin d'Arcachon, les espèces du genre *Vibrio* ont été recherchées dans l'eau et les produits marins (huîtres, moules, mactres, bigorneaux, seiches, crabe vert, araignée, crevettes, poissons et algues) ; tous ces produits (sauf un) contenaient une ou plusieurs espèces

de *Vibrio*. Au total 80 souches représentant 14 espèces ont été identifiées précisément. *V. parahaemolyticus* a été détecté en mars dans l'eau ($T = 11-13^{\circ}\text{C}$) et en mai ($15-18^{\circ}\text{C}$) et juillet ($21-23^{\circ}\text{C}$) dans les bivalves et crustacés, *V. cholerae non O1* a été détecté uniquement dans l'eau et les crabes verts en mars et mai (Urdaci et al., 1988). Ces auteurs pensent qu'il faudrait inclure la recherche de vibrios pathogènes dans la surveillance sanitaire des produits marins.

Une étude hollandaise effectuée par Broek et al. (1979) sur des moules a montré que de nombreux échantillons hébergeaient *V. parahaemolyticus* toute l'année sans que cela pose un problème de santé publique car en général ces moules sont consommées cuites ou marinées. Cependant il faut rester très vigilant car une simple conservation à température élevée peut entraîner une multiplication massive et inattendue (voir 4.3).

4.1.3. Zones de pêche à pied

Les zones de pêche à pied ne sont pas encore surveillées systématiquement en France, comme le sont les zones d'élevage ainsi que les centres d'expédition des coquillages, aussi est-il difficile d'appréhender les risques sanitaires liés à la pêche. Cependant, la présence de vibrios pathogènes dans les estuaires de la côte méditerranéenne par exemple, ou encore en toute zone côtière estuarienne où la température de l'eau est plus élevée et moins salée (panaches de centrales nucléaires ou autre) est possible.

4.2. *Interaction existant entre les bivalves et les bactéries*

4.2.1. Généralités

La question importante est de savoir si les bactéries peuvent ou non servir de nourriture aux bivalves filtreurs.

Une étude ancienne de Zobell et Feltham (1938) montre qu'une grande partie de la suspension bactérienne offerte à la moule (*Mytilus californiensis*) est ingérée, tandis que l'autre partie est rejetée dans les pseudofécès ; aucune différence n'est notée entre les bactéries gram (-) et les bactéries gram (+). Cependant les moules ne prospèrent pas aussi bien que dans la mer, celle-ci offrant des sources d'alimentation plus variée. Autre constatation : la présence des bactéries en agrégats favorise l'absorption par les bivalves. Une autre expérience effectuée par ces chercheurs met en présence huîtres et bactéries (unique source de nourriture) pendant plusieurs mois : le développement des huîtres est normal et le contenu glycogénique est même en augmentation.

Tubiash (1974) ne partage pas cette théorie d'une alimentation exclusivement bactérienne : il prétend que pour *Crassostrea virginica* la valeur nutritive des bactéries est trop faible, malgré une filtration active de ce bivalve.

L'intérêt majeur d'une alimentation bactérienne est un apport d'azote (deux fois plus abondant dans les bactéries que dans le phytoplancton) et dans le cas de bactéries aggrégées ou non, un apport simultané de carbone et d'azote, respectivement plus ou moins important. Les bactéries hétérotrophes peuvent également fournir de la matière organique dissoute aux bivalves par recyclage des fécès de ceux-ci ou peut-être encore leur fournir des facteurs de croissance tels que les vitamines et les hormones, à travers la filtration (Prieur, 1990).

N.B. On sait aussi qu'il existe des mécanismes de compétition entre les bivalves et les bactéries pour la matière organique.

Pour les bivalves suspensivores, l'accumulation des bactéries va dépendre de leur abondance, de la présence en aggrégats, de l'espèce du bivalve, de la saison etc... Chez les bivalves déposivores, l'ingestion est plus efficace et moins dépendante de ces paramètres.

Dans le bivalve, il semble que la présence des cirres soit très importante : les bivalves possédant les plus grands cirres retiennent mieux les petites particules que ceux possédant de petits cirres. Ils agiraient comme modulateurs dans le mécanisme de rétention particulaire. Par exemple, chez *Crassostrea virginica* qui a de petits cirres, les particules de taille inférieure à 5 à 6µm sont totalement retenues, tandis qu'en présence de tailles de 2µm l'efficacité n'est que de 15% ; chez *Mercenaria mercenaria*, il faut des particules de 4µm pour observer une rétention totale de celles-ci. Avec des tailles de 2µm l'efficacité de la rétention atteint 50% (Rissgard, 1988). La sécrétion de mucus peut agir dans le sens inverse en empêchant une multiplication bactérienne à l'intérieur du bivalve ; cette activité, liée aux mouvements ciliaires explique pour Garland et al. (1982) l'absence de microflore associée à l'huître *Crassostrea gigas*.

L'efficacité de rétention et le taux de pompage varient selon les espèces de coquillages et la taille des particules. On connaît peu de choses concernant les bactéries elles-même en tant que particules. Une étude de Mc Henery et Birckbeck (1985) a montré toutefois que la présence de microalgues augmentait le taux de clearance (faculté à épurer l'eau de toutes ses particules) de bactéries non aggrégées par *Mytilus edulis*. En ce qui concerne les variations dues au type de coquillage, Hood et Ness (1984) notent que l'huître (*Crassostrea virginica*) abriterait plus volontiers des vibrios que le clam (*Mercenaria campechiensis*). Cette différence d'ingestion microbienne entre l'huître et le clam est également notée par Kueh et Chan (1985).

Au cours de la digestion des bactéries par le mollusque, celles-ci emplissent rapidement tout le système digestif : le matériel dissous est directement assimilé et digéré tandis que les composants des parois cellulaires passent dans la glande digestive pour dégradation ultérieure. Dans ce processus où l'activité lysozymique intervient, c'est la sensibilité propre de chaque bactérie aux lysozymes qui est déterminante ; certaines bactéries sont ainsi rejetées. Les

lysozymes se trouvant dans le stylet cristallin sont libérés dans l'estomac où ils agissent à pH plutôt acide (mais variable encore une fois selon les espèces de bivalves) ; après la lyse des bactéries, des enzymes telles que les protéases, les lipases, les estérases et les phosphatases rentrent en scène pour dégrader les constituants bactériens dans la glande digestive du mollusque. En général, la population bactérienne des huîtres (*Crassostrea gigas*) est protéolytique et capable à 50% de fermenter le glucose en anaérobiose. Par contre, elle est peu saccharolytique (Colwell et Liston, 1960). Quelques unes des activités enzymatiques faibles détectées dans les tissus digestifs des bivalves pourraient d'ailleurs être le fait des bactéries et non des bivalves (Prieur, 1981).

D'après Prieur (1981), il faut 15 minutes pour que les bactéries se trouvent à tous les niveaux du système digestif de *Mytilus edulis* et 3 heures pour que l'on puisse observer les bactéries lysées au niveau de l'estomac (en particulier *Vibrionaceae*, *Pseudomonaceae* et *Kurthia*).

4.2.2. Processus d'accumulation des vibrios

Nous avons souligné auparavant que les vibrios faisaient partie de la flore commensale des bivalves. Prieur (1981) dans sa thèse, suggère que la microflore du tractus digestif des bivalves marins se crée grâce à la conjonction de plusieurs facteurs : d'abord la présence de ces bactéries dans l'eau de mer, puis un transit lent des bactéries dans l'intestin (au moins 6 heures), ensuite une élimination très lente (48 à 72 heures) pendant laquelle les bactéries peuvent se développer si les conditions internes sont favorables : pH basique et anaérobiose (particulièrement favorable aux vibrios). Barbosa (1987) montre par contre que le facteur important dans l'accumulation est surtout la faculté à dégrader la matière organique plutôt que les conditions d'anaérobiose. Le siège de l'accumulation maximum se trouverait dans l'intestin postérieur.

Des expériences en laboratoire menées par Rodrick et Schneider (1991) avec *Mercenaria campechiensis* et les deux vibrios *V. cholerae non O1* et *V. vulnificus* montrent que l'accumulation est maximum en 60 à 90 minutes pour *V. cholerae non O1* et en 60 minutes pour *V. vulnificus* (même constatation pour Murphy et Oliver avec *Crassostrea virginica*). D'autre part c'est dans la glande digestive que l'accumulation est la plus importante, puis dans les branchies et enfin dans le manteau, les gonades et l'hémolymphe (Tab. 3 et 4).

Groubert et Oliver (1992) ont effectué d'autres études pour arriver à savoir si le passage à travers l'huître ne modifiait pas la virulence de *V. vulnificus* : d'une part l'accumulation est aussi rapide pour les souches translucides que pour les souches opaques, d'autre part aucune variation de virulence n'est détectée lors du passage des bactéries dans le bivalve.

Tableau 3 : Distribution de *V. cholerae non O1* dans les tissus sélectifs du clam *Mercenaria campechiensis*. Les clams sont exposés à $4,3 \cdot 10^7$ *V. cholerae non O1* pendant 60 et 90 minutes dans 5 litres d'eau de mer à 25°C, 30 g/l NaCl + algues (d'après Rodrick et Schneider, 1991)

Temps d'exposition (minutes)	NPP par gramme de tissu de <i>Mercenaria campechiensis</i>				
	Glande digestive	Gonades	Manteau	Branchies	Hémolymphe
0	<3	<3	<3	<3	<3
60	$5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$
90	$2,1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^4$

Tableau 4 : Distribution de *V. vulnificus* dans les tissus sélectifs du clam *Mercenaria campechiensis*. Les clams sont exposés à $4,3 \cdot 10^5$ *V. vulnificus* pendant 60 et 90 minutes dans 2 litres d'eau de mer à 25°C, 32 g/l Na Cl + algues (d'après Rodrick et Schneider, 1991)

Temps d'exposition (minutes)	UFC par gramme de tissu de <i>Mercenaria campechiensis</i>				
	Glande digestive	Gonades	Manteau	Branchies	Hémolymphe
0	<3	<3	<3	<3	<3
60	$8,4 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$
90	$6,2 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$

De nombreuses études effectuées sur la microflore de bivalves (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes philippinarum*, *Mercenaria mercenaria*, *Mya arenaria*) et sur l'eau environnante montrent que le genre *Vibrio* est très bien représenté dans le tractus digestif de ces animaux. Il y est associé à d'autres bactéries comme les *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Photobacterium*, *Corynebacterium*, et il se trouve toujours en quantité plus importante dans les bivalves que dans l'eau (Prieur, 1981; Greenberg et al., 1984; Kueh et Chan, 1985). Ces bactéries seraient en fait bien adaptées physiologiquement à la vie dans le microenvironnement des coquillages (Colwell et Liston, 1960). L'estimation quantitative de la microflore de l'huître *Crassostrea gigas* effectuée par ces derniers est en accord avec celle faite par Lovelace et Tubiash (1968) sur *Crassostrea virginica*, seules quelques variations dans la composition de cette microflore ayant été observées selon les lieux de prélèvements

Les bivalves constituent une importante niche écologique pour ces bactéries hétérotrophes. La population microbienne, de type opportuniste, se mettrait en place dans les coquillages à partir de la population bactérienne de l'eau de mer par le biais de la filtration. Dans les pays froids par exemple, lorsque la température de l'eau descend jusqu'à 0°C, les bivalves cessent de s'alimenter et la microflore est alors très réduite (Cook, 1991). De même pour Kelly et Dinuzzo (1985) *V. vulnificus* sera vite éliminé par l'animal si l'eau environnante est bactériologiquement non polluée. Il ne sera qu'un hôte de transition et non un commensal. Cette microflore est donc éminemment variable et dépend alors aussi de la saison et du lieu (Cook, 1991).

4.3. Survie des vibrios dans les bivalves stockés.

Cette capacité à se développer dans le tractus digestif du bivalve permet une survie accrue et engendre des problèmes pendant les opérations de mise en marché, entre la récolte et la consommation.

En général c'est la température de conservation qui joue le rôle le plus important :

– chez *V. cholerae*, les études de Hood et Ness (1984) et Reily et Hackney (1985) ont révélé que la bactérie survivait très bien à des chocs froids : ainsi, à 2°C, le nombre de *V. cholerae* augmente significativement puis diminue jusqu'au 7ème jour et remonte ensuite au niveau initial, tandis qu'à 7°C des souches de laboratoire persistent à taux élevés dans des homogénats d'huîtres pendant au moins 21 jours; à 10°C enfin *V. cholerae* est également présent sans multiplication (Cook et Ruppel, 1989).

– chez *V. parahaemolyticus*, une température de 20–25°C provoquerait un développement important pendant les quatre premiers jours dans l'huître *Crassostrea commercialis* (jusqu'à 20 fois plus) puis une diminution, puis une reprise (Son et Fleet, 1980) ou encore ce même développement dans *Crassostrea virginica* pendant les 7 premiers jours puis un déclin (Hood et Ness, 1984). Certains auteurs suggèrent une inhibition de *V. parahaemolyticus* par les *Pseudomonas*, genre dominant dans les huîtres stockées : cette inhibition est importante à température de 25°C avec des pH modérés et une salinité faible (Goatcher et Westhoff, 1975). A 10 °C Cook et Ruppel, (1989) constatent une persistance de la bactérie sans multiplication. A faible température la bactérie serait inhibée et entrerait éventuellement dans un stade VNC (Van den Broek et al, 1979).

– chez *V. vulnificus*, l'étude de Murphy et Oliver (1992) montre bien qu'une élévation de température (supérieure à 22°C) contribue à une diminution des bactéries dans les bivalves (par contre une élévation du nombre de bactéries totales est constatée). *V. vulnificus* reste cultivable à toutes les températures pendant au moins dix jours et aucune différence significative entre les souches opaques et translucides n'est observée. (Fig. 14 et 15). Par contre, Hood et Ness (1984) ont observé une augmentation de *V. vulnificus* à 8°C et 20°C après 7 jours puis une diminution nette au bout de 14 et 21 jours. Pour Cook et Ruppel (1989), l'augmentation est sensible dès le premier jour de conservation à 22°C et 30°C. A 10°C la bactérie, toujours présente, ne se multiplierait plus mais persisterait au moins sept jours dans des huîtres contaminées naturellement. A basses températures (2–3°C), ces auteurs détectent toujours la bactérie au bout de quatorze jours, mais le risque de passage au stade VNC est grand (Kaysner et al, 1989).

Ainsi *V. cholerae* ne réagit pas comme *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* à des chocs froids. Dans l'ensemble, le nombre de *V. cholerae*, de *V. parahaemolyticus* et de *V. vulnificus* diminue avec le temps de conservation (Hood et Ness, 1984).

Il est suggéré également que des huîtres élevées dans des eaux de fortes salinité et température sont plus susceptibles d'entretenir des vibrios pendant la conservation que les autres (Hood et Ness, 1984).

Le conditionnement et la mise en conserve d'huîtres écoquillées et lavées est plus propice à la disparition des vibrios que les huîtres conditionnées entières ou intactes.

Les différences de résultats obtenus par ces chercheurs dans leurs études *in vitro* sont dues à plusieurs causes : l'accumulation des bactéries dans le bivalve par filtration naturelle ou

par injection directe dans l'intestin, l'utilisation de méthodes de culture de base (EPA et TCBS) ou de sondes génétiques et/ou anticorps monoclonaux, etc....

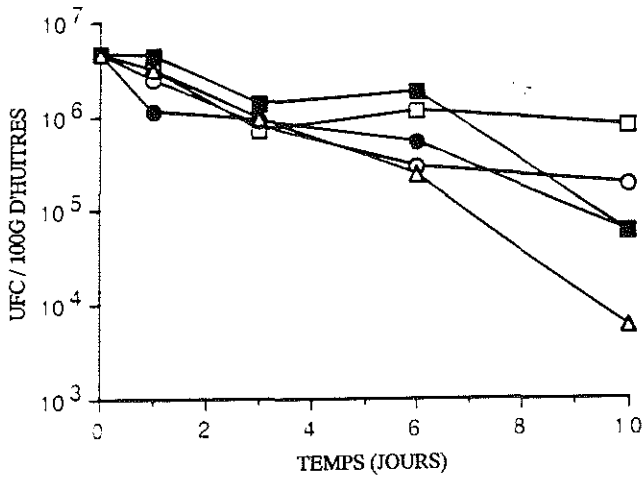


Fig. 14. Effet de la température sur la survie de *V. vulnificus* (opaque) dans les huîtres

0,5°C ○ 5°C □ 10°C ● 17°C ■ 22°C △

(d'après Murphy et Oliver, 1992)

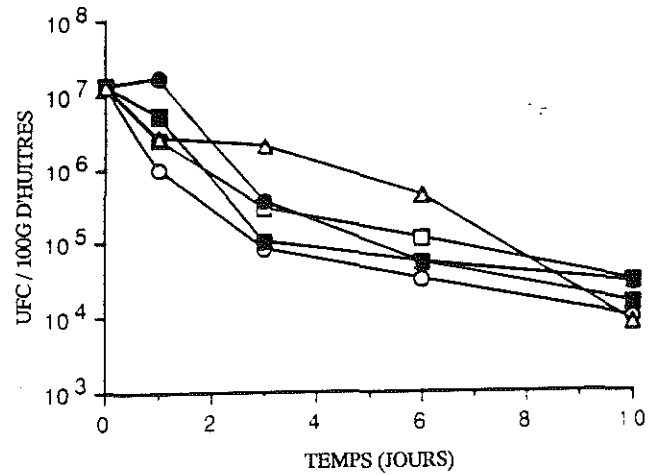


Fig. 15. Effet de la température sur la survie de *V. vulnificus* (translucide) dans les huîtres

4.4. Purification

4.4.1. Par reparcage

La purification par reparcage en milieu salubre a été étudiée pour *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* dans les huîtres :

- si les huîtres sont **naturellement** contaminées par *V. parahaemolyticus*, avec une contamination initiale d'environ $2 \cdot 10^3$ cellules/100g Son et Fleet (1980) estiment qu'il faut au moins six jours pour les purifier.
- si les huîtres sont **naturellement** contaminées par *V. vulnificus*, avec un concentration initiale de 10^3 cellules/100g, Jones et al. (1992) obtiennent une diminution forte (bien qu'incomplète) en sept jours sur *Crassostrea virginica* : le résultat est meilleur en octobre qu'en août-septembre.

Après contamination **artificielle**, la contamination initiale étant d'environ $2 \cdot 10^3$ cellules/100g, il faut quinze jours pour que *Crassostrea virginica* élimine totalement *V. vulnificus* (Kelly et Dinuzzo, 1985).

4.4.2. Par Ultra Violet

Lorsque l'huître *Crassostrea virginica* est contaminée **artificiellement** par *V. cholerae* O1 et qu'ensuite, elle est traitée par UV dans des bassins de purification, Murphree et Tamplin (1992) constatent que le nombre de bactéries diminue d'environ 1 unité log en trois jours, puis reste stationnaire jusqu'au sixième jour.

En ce qui concerne *V. parahaemolyticus* et sa présence par une contamination **artificielle** dans l'huître *Crassostrea gigas*, Son et Fleet (1980) constatent qu'il faut trois jours pour passer d'un niveau initial de $9 \cdot 10^7$ bactéries/100g d'huître à un niveau de $8 \cdot 10^2$ bactéries/100g ; l'élimination est la plus forte durant le premier jour. Greenberg et al (1984) constatent également un maintien du taux de *V. parahaemolyticus* dans les clams épurés lorsque ceux-ci sont contaminés **artificiellement** : il y a passage de 10^5 bactéries/100g à 10^4 bactéries en trois jours.

Eyles et Davey (1984) ont montré qu'un traitement par UV en station de purification pendant 48 h n'avait pas d'effet significatif sur le taux de *V. parahaemolyticus* accumulés **naturellement** par *Crassostrea commercialis*.

Si les huîtres sont colonisées **naturellement** par *V. vulnificus*, aucune diminution n'est constatée au bout de 48 heures par Jones et al. (1992). Tamplin et Capers (1992) confirment ce manque d'épuration ; ils ajoutent qu'à température de 23°C, la bactérie se multiplie dans les tissus (surtout hémolymphe, muscle adducteur et manteau) les effectifs pouvant augmenter de 5 unités log. Ensuite, elle est relâchée dans l'eau à des vitesses excédant l'activité bactéricide des UV et il peut alors y avoir recontamination. Par contre, à 15°C le niveau final est semblable au niveau initial (Fig. 16). En tant que bactérie autochtone, elle paraît réfractaire à la purification.

Si les huîtres sont contaminées **artificiellement**, elles peuvent s'épurer en 48 heures et on n'observe pas de différence d'épuration entre les souches opaques et les souches translucides de *V. vulnificus* (Groubert et Oliver, 1992).

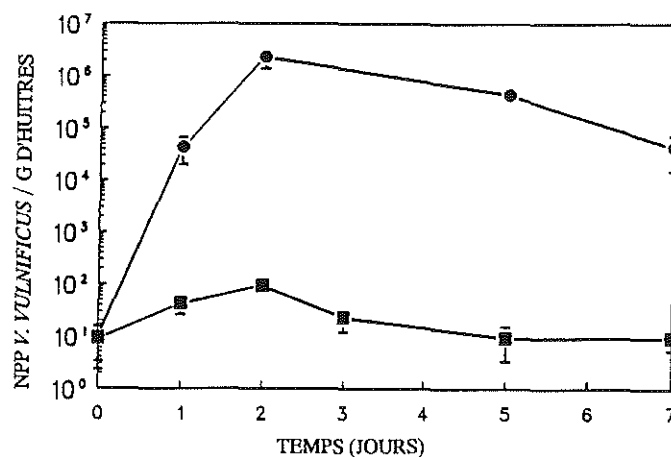


Fig 16. Effet de la température de l'eau sur la survie de *V. vulnificus* dans les huîtres *Crassostrea virginica* purifiées par ultraviolet
15°C ■ 23°C ● (d'après Tamplin et Capers, 1992)

Le manque d'efficacité de la purification contrôlée sur l'élimination des vibrios dans les bivalves est peut-être dû à leur association particulière avec les tissus des bivalves et aussi à leur capacité à se multiplier et à coloniser des tissus alors que d'autres bactéries sont éliminées (Greenberg et al., 1982). Ils peuvent également avoir développé des caractéristiques de survie qui leur permettent de rester associés aux bivalves même lorsque ceux-ci filtrent activement (Colwell et Liston, 1960) De manière générale, les populations bactériennes acquises naturellement par les coquillages, sont plus résistantes vis à vis de la purification que les souches inoculées en laboratoire.

Les résultats contradictoires observés sur la purification de coquillages contaminés par des vibrios peuvent venir de la concentration contaminante initiale, des différences dans les méthodes d'analyse et bien sûr du mode de contamination.

4.4.3. Par ionisation

Le traitement des aliments par ionisation a prouvé qu'il était sûr, réel et efficace dans le sens de la conservation des produits, d'une diminution des pertes après récolte, de l'élimination des nuisibles, de l'inactivation des parasites et de la destruction des pathogènes.

Cette technique utilise l'énergie sous forme de rayons X, de rayons gamma ou de particules bombardées à grande vitesse. La dose ionisante se mesure en Gray (Gy) et correspond à une énergie d' 1 Joule absorbée par Kg de nourriture traitée (le maximum de 10 kGy utilisé correspond donc à 2,4 calories). Aucune radioactivité ne peut donc être générée et atteindre alors les aliments.

La D10 est définie : c'est la dose nécessaire pour obtenir une réduction des bactéries d'une puissance de dix.

Les vibrios contenus dans les fruits de mer font partie des germes les plus sensibles aux radiations :

- une valeur du D10 de 0,1 kGy a été trouvée pour *V. parahaemolyticus* dans la crevette.
- une irradiation avec 1 kGy a permis d'éliminer 10^7 cellules de *V. cholerae* inoculées dans des homogénats d'huîtres

(Bandeekar et al. cité par Mallet et al., 1991)

- *V. vulnificus* disparaît en expérimentation dans les huîtres avec des doses de 1, 2 et 5 kGy ; à 0,25 kGy, sa présence dépend des milieux de culture utilisés. Cependant, plus la dose ionisante est forte, plus les huîtres meurent rapidement (Dixon et Rodrick, 1992).

CONCLUSION

Les trois espèces de vibrios décrites précédemment posent comme on le voit un problème de santé publique important dans le monde entier. La consommation de fruits de mer crus ou peu cuits, un développement bactérien durant les opérations de commercialisation lorsque le stockage est effectué à température inadéquate et une conservation imparfaite après cuisson, représentent des risques pour la santé publique, auxquels s'ajoutent les risques liés à la pêche récréative et au tourisme.

Ces espèces bactériennes se différencient par quelques caractères particuliers. Cependant leur adaptation au milieu estuarien passe par les mêmes exigences, en particulier un besoin en matière organique dissoute et particulaire et une association de type symbiotique avec les bivalves ; en commun également est leur caractère halotolérant.

Etant donné les préférences de température de chacune de ces bactéries, la probabilité de rencontrer *V. parahaemolyticus* dans nos pays sera plus forte que celle de rencontrer *V. cholerae* O1, et à fortiori *V. vulnificus*. Cependant les estuaires méditerranéens pourraient représenter des milieux favorables pour ces deux dernières. Nous remarquons qu'en France ces trois bactéries ne font pas l'objet de suivis systématiques, cependant l'on sait avec certitude que *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae non O1* sont présents dans de nombreuses zones littorales. Malgré le fait que la Directive Européenne ne prescrive pas la recherche systématique des vibrios (en particulier *V. parahaemolyticus*), il faut rester conscient que certains facteurs climatiques ("global change") ou biologiques (échanges génétiques par le biais de plasmides) peuvent "réveiller" des bactéries présentes dans le milieu actuellement exemptes de virulence, et que les migrations humaines à partir de continents touchés peuvent jouer également un rôle important dans la dissémination (foyer de vibrios cholériques dans les eaux potables de certaines régions d'Espagne). *V. cholerae* ne cesse de s'étendre et les épidémies sont évolutives par nature.

Nous formulerons quelques remarques supplémentaires :

- la résistance de *V. cholerae* aux basses températures pendant les opérations de commercialisation, permet de craindre sa présence à divers maillons de la chaîne de distribution. La purification par les UV utilisée pour traiter des bivalves contaminés par *V. cholerae* O1 montre que la bactérie persiste dans l'huître pendant au moins six jours.
- le risque d'intoxication avec *V. parahaemolyticus* en Europe existe surtout lors des opérations de commercialisation car cette bactérie est capable de se développer dans les bivalves après leur récolte si la température de stockage est trop élevée ; de plus, elle n'est pas éliminée par les coquillages pendant les opérations de purification par les U.V.

– quant à *V. vulnificus*, il peut persister dans les coquillages pendant sept jours à diverses températures, et de plus s'élimine très difficilement aussi bien par reparcage des bivalves que pendant les opérations de purification avec les U.V.

Afin de mieux connaître l'écologie de ces vibrios pathogènes et d'appréhender les risques, une bonne stratégie d'échantillonnage devrait inclure un grand nombre de microenvironnements : eau, sédiment, zooplancton et phytoplancton, végétaux, coquillages etc...

Plusieurs axes de recherche seraient à développer :

- une amélioration des techniques d'identification, en particulier avec les méthodes d'analyse des acides gras cellulaires et la technique d'hybridation ADN/ADN, celles-ci permettant de d'identifier les souches atypiques.
- une amélioration des techniques de détection de la toxigenicité des souches, et une meilleure compréhension de l'expression de celle-ci en fonction du milieu récepteur, en particulier en ce qui concerne les *V. cholerae O1* et *non O1*.
- le développement de marqueurs de virulence et la détermination précise de la dose infectieuse.
- la recherche d'un vaccin permettant de se protéger efficacement contre le choléra.
- la définition d'un indicateur fiable car les indicateurs traditionnels de pollution ne sont pas corrélés positivement à la présence de ces bactéries.
- un système d'épuration efficace contre ces bactéries, en particulier des recherches supplémentaires sur l'ionisation, procédé dont l'efficacité semble assez prometteuse.

BIBLIOGRAPHIE

- Barbosa T.C. (1987). Le processus d'accumulation des bactéries chez les mollusques bivalves. Etude expérimentale chez *Mytilus edulis*. *Thèse Doct. Océanogr. Biol. Brest* 134 pp.
- Baumann P. et Schubert H.W. (1984). Family II. *Vibrionaceae* Véron 1965, 5245 – Dans : *N.R. Krieg and Holt J.G. ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1^o ed. Vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore : 516–550.*
- Baumann P. , Furniss A.L. et Lee J.V. (1984). Genus I. *Vibrio*, Paccini 1854 – Dans : *N.R. Krieg and Holt J.G. ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1^o ed. Vol. 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore : 518–550.*
- Bebear C., Richard C., Riou J.Y., Texier J. et Broustet A. (1982). A propos d'un cas de septicémie à vibron halophile lactose positif – *Médecine et Maladie Infectieuses* 12(4) : 247–250.
- Bertrand J.C. et Larsen H. (1989). La bactérie marine : mythe ou réalité. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques* . M. Bianchi et al. – Ed. Masson : 3–25.
- Birbeck T.H., Mc Henery J.G. et Nottage A.S. (1987). Inhibition of filtration in bivalves by marine vibrios – *Aquaculture vol. 67 : 247–248*
- Bolinches J., Toranzo A.E., Silva A. et Barja J.L. (1986). Vibriosis as the main causating factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in Northwestern Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 6(1) : 1–4.
- Brown C. and Tettelbach L.P. (1988). Characterization of a non motile *Vibrio sp.* pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* – *Aquaculture vol. 74 : 195–204.*
- Buck J.D. (1990). Potentially pathogenic marine *Vibrio* species in seawater and marine animals in the Sarasota, Florida Area – *J. Coastal Res.* 6(4) : 943–948.
- Cabane F. (1982). Revue bibliographique sur les germes pathogènes en relation avec les méthodes de surveillance sanitaire – *Rapport interne COB* 25p.

- Colwell R.R. et Liston J. (1960). Bacterial study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) – *Appl. Microbiol. vol. 8 : 104–109.*
- Colwell R.R., West P.A., Maneval D., Renmers E.F., Elliot E.L. et Carlson N.E. (1984) Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay – *Vibrios in the environment. R.R. Colwell ed : 367–387*
- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A. et Palmer L.M. (1985). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release of genetically engineered microorganisms – *Bio/Technology 3 : 817–820.*
- Cook D.W. (1991). Microbiology of bivalve molluscan shellfish – *Dans : Microbiology of marine food products – Ward and Hackney ed.: 19–39.*
- Cook D.W. et Ruppel A.D. (1989). *Vibrio vulnificus* in post harvest shellstock and processed Gulf Coast oysters – *J. Shellfish Res. 8(2) p. 449 – Résumé.*
- Coquillages et Santé Publique – Du risque à la prévention – (1992) – *Coordin. Jean Lesne – E.N.S.P. ed.*
- Dixon D.W. et Rodrick G.E. (1992). The effects of ionizing radiation, high energy electron beams, and depuration on shellstock oyster shelflife and *Vibrio vulnificus* content – *2nd Conf Intern. Purif. Coquil. Rennes.*
- Dodin A. et Fournier J.M. (1992). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du Vibriion cholérique et des autres vibriions – *Commission des Laboratoires de référence et d'Expertise – Inst. Pasteur Ed.*
- Douet J. P. (1992) Contribution à l'étude du pouvoir pathogène de *Vibrio parahaemolyticus* :
 – purification et caractérisation de l'hémolysine thermostable, étude de ses récepteurs
 – rôle d'une protéine de surface de la membrane externe dans le phénomène de l'adhésion
Thèse Doct. Sciences de la vie Univ. Bordeaux : 153p.
- Douet J.P., Castraviejo M., Dodin A. et Bebear C. (1992). Purification and characterization of Kanagawa haemolysin from *V. parahaemolyticus* – *Res. Microbiol. ol 143 : 569–577.*

- Dumas J, Bordet P., Laporte R., Lepine P et Prevot A.R. (1951). Bacteriologie médicale – *Editions Médicales Flammarion*.
- Eyles M.J. (1986). Microbiological hazards associated with fishery products. *CSRIO Food Res. Q vol. 46 : 8–16*.
- Eyles M.J. et Davey G.R. (1984). Microbiology of commercial depuration of the Sydney Rock oyster *Crassostrea commercialis* – *J. Food Prot. 47(9) : 703–706*.
- Eyles M.J. et Davey G.R. (1988). *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster producing area of two urban estuaries in Australia – *Intern. Journ. Food Microb. vol. 6 : 207–218*
- Eyles M.J., Davey G.R., Arnold G. et Wane H.M. (1985). Evaluation of methods for enumeration and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters – *Food Technology in Australia 37(7) : 302–304*.
- Garland C.D., Nash G.V. et Mc Meekin T.A. (1982). Absence of surface associated microorganisms in adult oysters – *Appl. Env. Microbiol. 44(5) : 1205–1211*.
- Gauthier M. et Pietri C. (1989). Devenir des bactéries et virus entériques en mer. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. M. Bianchi et al. – Ed. Masson : 320–339*.
- Glass R.I., Libel M., et Brandling–Bennett A.D. (1992). Epidemic cholera in the Americas – *Science vol.256 juin*.
- Goatcher L.J. et Westhoff D.C. (1975). Repression of *Vibrio parahaemolyticus* by *Pseudomonas* species isolated from processed oysters – *J. Food Sci. vol. 40 : 533–536*.
- Greenberg E.P., Kaplan H.B., Duboise M. et Palhof B. (1984). Persistence and distribution of marine vibrios in the hardshell clam – *Vibrios in the environmen t– R.R.Colwell ed. : 479–493*.
- Grimes D.J. (1991). Ecology of estuarine bacteria capable of causing human disease : a review. *Estuaries 14(4) : 345–360*.

- Groubert T. et Oliver J.D. (1992). Uptake and depuration of the opaque and translucent morphotypes of *Vibrio vulnificus*, and the effects of oyster passage on virulence – *2nd Conf. Internat. Purif. Coquil. Rennes*
- Guthrie R.K. et Scovill M.A. (1984). Recovery of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* from aquatic microcosms – *Wat. Res. 18(8) : 1055–1057.*
- Hood M.A. et Ness G.E. (1982). Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments – *Appl. Env. Microb. 43(3) : 578–584.*
- Hood M.A. et Ness G.E. (1984). The effects of storage on vibrio concentrations in shellfish – *Vibrios in the environment – R.R. Colwell ed.*
- Hood M.A., Ness G.E., Rodrick G.E. et Blake N.J. (1984). The ecology of *Vibrio cholerae* in two florida estuaries – *Vibrios in the environment – R.R.Colwell ed. : 399–409.*
- Huq E., Small E.B., West P.A. et Colwell R.R. (1984). The role of planktonic copepods in the survival and multiplication of *Vibrio cholerae* in the aquatic environment – *Vibrios in the environment – R.R.Colwell ed. : 521–534.*
- Janda J.M., Powers C., Bryant R.G. et Abbott S.L. (1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio spp.* – *Clin. Microb. Rev. 1(3) : 245–267.*
- Jayet B. (1992). Approche de l'évaluation et de la gestion des risques sanitaires associés à la consommation de moules récoltées par la pêche à pied en Seine Maritime – *Mémoire de fin d'études E.N.S.P.*
- Jones S.H., O'Neill K.R., Howell T.L. et Langan R. (1992). Strategies for removal of pathogenic bacteria from commercially-harvested shellfish – *2nd Conf. Intern. Pur. Rennes*
- Jones S.H., Howell T.L. et O'Neill K.R. (1991). Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio sp.* from eastern oysters (*Crassostrea virginica Gmelin, 1791*) in a commercial controlled purification facility in Maine – *J. Shellfish Res. 10(1) : 105–112.*
- Jones M.V., Wood M.A. et Herd T.M. (1992). Comparative sensitivity of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and *E. coli* to disinfectants – *Letters in Eppl. Microb. vol.14 : 51–53.*

- Joseph S.W., Colwell R.R. et Kaper J.B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios – *C.R.C. Crit. Rev. Microb.* 10(1) : 77–124.
- Kaneko T. et Colwell R.R. (1978). The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay – *Microb. Ecol.* vol. 4 : 135–155.
- Kaper J.B., Remmers E.F. et Colwell R.R. (1980). A medium for presumptive identification of *Vibrio parahaemolyticus* – *J. Food Prot.* 43 (12) : 936–938.
- Kaysner C.A., Abeyta C.JR., Wekell M.M., DePaola A.JR., Stott R.F. et Leitch J.M. (1987). Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast – *Appl. Envir. Microbiol.* 53(6) : 1349–1351.
- Kaysner C.A., Tamplin M.L., Wekell M.M., Stott R.F. et Colwell K.G. (1989). Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery – *Appl. Env. Microbiol.* 55(12) : 3072–3079.
- Kelly, M.T. (1982). Effect of temperature and salinity on *Vibrio* (Beneckea) *vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment – *Appl. Envir. Microbiol.* vol. 44 : 820–824.
- Kelly M.T. et Dinuzzo A. (1985). Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*) – *Appl. Env. Microbiol.* vol. 50 : 1548–1549.
- Kueh C.S.W. et Chan K.Y. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster – *J. Appl. Bacteriol.* vol. 59 : 41–47.
- Kogure K., Simidu U. et Taga N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria – *Can. J. Microbiol.* vol. 25, 415–420.
- Lee J.V., Bashford D.J., Donovan J.J., Furniss A.L. et West P.E. (1984). The incidence and distribution of *Vibrio cholerae* in England – *Vibrios in the environment* – R.R.Colwell ed. : 427–450.
- Lehninger A.L. (1985). Principes de biochimie – Editions Flammarion Médecines–Sciences.

- Lovelace T.E., Tubiash H. et Colwell R.R. (1968). Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay – *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* vol. 58 : 82–87.
- MacDonell M.T., Baker R.M., Singleton F.L., et Hood M.A (1984). Effects of surface association and osmolarity on seawater microcosm populations of an environmental isolate of *Vibrio cholerae* – *Vibrios in the environment* – R.R.Colwell ed. : 535–549.
- Mallet J.C., Beghian L.E. et Metcalf (1991). Potential of irradiation technology for improved shellfish sanitation – *Molluscan Shellfish Depuration* – Otwell, Rodricks, Martin ed.: 247–270.
- Massad G, et Oliver J.D., (1987). New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* – *Appl. Env. Microbiol.* vol. 53 : 2262–2264.
- Mc Henery J.G. et Birbeck T.H. (1985). Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves – *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* vol 90 : 145–163.
- Murphree R.L. and Tamplin M.L. (1992). Retention of *Vibrio cholerae* O1 in *Crassostrea virginica* under conditions of controlled purification – *J. Shellfish Res. (Abstract only)* 21–25 mai : p.202.
- Murphy S. et Oliver J.D. (1992). Effects of temperature abuse on survival of *Vibrio vulnificus* in oysters – *2nd Conf. Intern. Purif. Coquil. Rennes.*
- Nair G.B., Bhadra R.K., Ramamurthy T., Ramesh A. et Pal S.C. (1991). *Vibrio cholerae* and other vibrios associated with paddy field cultured prawns – *Food Microbiol.* vol. 8 : 203–208.
- Nair G.B., Misra S., Bhadra R.K. et Pal S.C. (1987). Evaluation of the multitest medium for rapid presumptive identification of *Vibrio cholerae* from environmental sources – *Appl. Env. Microbiol.* 53(5) : 1203–1205.
- Oliver J.D., Warner R.E. et Cleland D.R. (1983). Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose–fermenting vibrios in the marine environment – *Appl. Env. Microbiol.* vol. 45 : 985–998.

- O'Neill K.R., Jones S.H., Howell T.L. et Grimes D.J. (1991). Occurrence of *Vibrio vulnificus* in water and shellfish from Maine and New Hampshire – *Molluscan Shellfish Depuration – Otwell, Rodricks, Martin ed* : 189–195.
- O'Neill K.R., Jones S.H. et Grimes D.J. (1992). Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine – *Appl. Env. Microbiol.* 58(10) : 3257–3262.
- Ortigosa M., Esteve C. et Pujalte M.J. (1989). *Vibrio* species in seawater and mussels : abundance and numerical taxonomy – *Syst. Appl. Microb.* vol. 12 : 316–325.
- Pace I. et Chai T.J. (1989). Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* grown in estuarine and rich medium – *Appl. Env. Microbiol.* 55(8) : 1877–1887.
- Pal A., Ramamurthy T., Bhadra R.K., Takeda T., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B., Pal S.C. et Chakrabarti S. (1992). Reassessment of the prevalence of heat stable enterotoxin (NAG-ST) among environmental *Vibrio cholerae non O1* strains isolated from Calcutta India, by using a NAG-ST probe – *Appl. Envir. Microbiol.* 58(8) : 2485–2489.
- Prieur D. (1981). les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. *Thèse Doct. Etat Sci. Nat. Brest* : 266pp.
- Prieur D., Barbosa T. et Marhic A. (1985). Les communautés bactériennes des mollusques bivalves et du sédiment en rade de Brest. *Océanis* 11(3) : 287–294.
- Prieur D., Mevel G., Nicolas J.L., Plusquellec A., et Vigneulle M. (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment – *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* vol 28 : 277–352.
- Plusquellec A. (1992). Salmonella et Bivalves marins – *Revue Bibliographique – Contrat Ifremer* 199 p.
- Reily L.A. et Hackney C.R. (1985). Survival of *Vibrio cholerae* during cold storage in artificially contaminated seafoods – *J. Food Sci.* vol. 50 : 838–839.
- Rissgard H.U. (1988). Efficiency of particle retention and filtration rate in six species of Northeast american bivalves – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* vol. 45 : 217–223.

- Rivera S., Lugo T. et Hazen T.C. (1989). Autoecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters – *Wat. Res.* 23(7) : 923–931.
- Rodrick G.E. (1991). Indigenous pathogens : vibriaceae – Microbiology of marine food products – *Ward and Hackney ed.* : 285–300.
- Rodrick G.E., Blake N.J., Tamplin M., Cornette J.E., Cuba T. et Hood M.A. (1984) – The relationship between fecal coliform levels and the occurrence of vibrios in Apalachicola Bay, Florida – *Vibrios in the environment* – R.R.Colwell ed. : 567–575.
- Rodrick G.E. et Schneider K.R. (1991). Vibrios in depuration – dans : *Molluscan Shellfish Depuration* – Ed. Otwell Rodrick Martin : 115–129.
- Sato M.I.Z., Monteiro C.K., Stoppe N.C. et Sanchez P.S. (1992). Shellfish and marine water microbiological quality – *Envir. Tox. Wat. Qual.* vol. 7 : 95–105.
- Seidler R.J. et Evans J.M. (1984). Computer assisted analysis of *Vibrio* field data : four coastal areas – *Vibrios in the environment* – R.R.Colwell ed. : 411–425.
- Shimada T. et Sakazaki R. (1984) . On the serology of *Vibrio vulnificus* – *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 37 : 241–246.
- Shimada T. et Sakazaki R. (1988). A serogroup of non O1 *Vibrio cholerae* possessing the *Inaba* antigen of *Vibrio cholerae* O1 – *J. Appl. Bact.* vol 64 : 141–144.
- Shimada T., Sakazaki R., et Oue M. (1987). A bioserogroup of marine vibrios possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* O1 – *J. Appl. Bact.* 62 : 453–456.
- Shimada T., Sakazaki R. et Tobita K. (1987). *Vibrio fluvialis* : a new serogroup (19) possessing the *Inaba* factor antigen of *Vibrio cholerae* O1 – *Japan J. Med. Sci.* 40 : 153–157.
- Siebeling et Simonson (1990). Rapid identification of *Vibrio vulnificus* from oyster shellfish – *Annual Meeting April 1–5 – Résumé.*
- Singleton F.L., Atwell R.W., Jangi M.S. et Colwell R.R. (1982). Influence of salinity and organic nutrient concentration on growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms – *Appl. Env. Microbiol.* vol.37 : 750–759.

- Sloan E.M., Curtis C.J., Lancette G.A., Peeler J.T. et Sofos J.N. (1992). Comparison of five selective enrichment broths and two selective agars for recovery of *Vibrio vulnificus* from oysters – *J. Food Protec.* 55(5) : 356–359.
- Son N.T.S. et Fleet G.H. (1980). Behavior of pathogenic bacteria in the oyster *Crassostrea commercialis* during depuration, relaying and storage – *Appl. Env. Microbiol.* 40(6) : 994–1002.
- Spira W.M. (1984). Tactics for detecting pathogenic vibrios in the environment – *Vibrios in the environment* – R.R.Colwell ed. : 251–268.
- Tamplin M.L. (1989). The ecology of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* – *J. Shellfish Res.* 8(2) p. 451 – Résumé.
- Tamplin M.L. et Capers G.M. (1992). Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters *Crassostrea virginica* exposed to seawater disinfected with U.V. light – *Appl. Env. Microbiol.* 58(5) : 1506–1510.
- Tamplin M.L., et Colwell R.R. (1986). Effects of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin – *Appl. Env. Microbiol.* 52(2) : 297–301.
- Tamplin M.L., Rodrick G.E., Blake N.J., et Cuba T. (1982). Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries – *Appl. Env. Microbiol.* vol. 44 : 1466–1470.
- Tamplin M.L., Gauzens A.L., Huq E., Sack D.A., et Colwell R.R. (1990) Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters – *Appl. Env. Microbiol.* 56(6) : 1977–1980.
- Tamplin M.L., Martin E.L., Ruple E., Cook D.E. et Kaspar C.W. (1991). Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment and shellfish – *Appl. Env. Microbiol.* vol 57 : 1235–1240.
- Tomayosu T. (1992). Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study – *Appl. Env. Microbiol.* 58(8) : 2679–2682.

- Urdaci M.C., Marchand M. et Grimont P.A.D. (1988). Espèces du genre *Vibrio* associée aux produits marins du Bassin d'Arcachon – *Ann. Ins. Pasteur / Microbiologie vol 139* : 351–362.
- Urdaci–Bertran M.C. (1987). Le genre *Vibrio* : approche éco–épidémiologique et taxonomie des espèces isolées du Sud Ouest européen – *Thèse Doct. Univ. Bordeaux I* : 181p.
- Van den Broek M.J.M., Mossel D.A.A. et Eggenkamp A.E. (1979). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in dutch mussels – *Appl. Env. Microbiol.* 37(3) : 438–442.
- Venkateswaran K., Kiiyukia C., Nakanishi K., Nakano H, Matsuda O. et Hashimoto H. (1990). The role of sinking particles in the overwintering process of *Vibrio parahaemolyticus* in a marine environment – *Fems Microbiol. Ecol.* 73(2) : 159–166.
- Venkateswaran K., Kim S.W., Nakano H., Onbé T. et Hashimoto H. (1989). The association of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes with zooplankton and its relationship with bacterial indicators of pollution – *Syst. Appl. Microbiol. vol. 11* : 194–201.
- Vila J., Abdalla S., Gonzalez J., Garcia C., Bombi J.A., et Jimenez de Anta M.T. (1992). A one minute oxydase–test to detect *Vibrio* strain isolated from cultures on TCBS medium – *J. Appl. Bacter. vol. 72* : 490–492.
- Watkins W.D. et Cabelli V.J. (1985). Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment – *Appl. Env. Microbiol.* 49(5) : 1307–1313.
- West P.A. et Lee J.V. (1982). Ecology of *Vibrio* species including *Vibrio cholerae* in natural waters in Kent, England.– *J. Appl. Bacter. vol.52* : 435–448.
- Wolf P. et Oliver J.D. (1992). Temperature effects on the viable but non culturable state of *Vibrio vulnificus* – *Fems Microb. Ecol. vol 101* : 33–39.
- Xu H.S., Robert N., Singleton F.L., Atwell R.W., Grimes D.J. et Colwell R.R. (1982). Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment – *Microb. Ecol. vol. 8* : 313–323.

Youngreen – Grimes B.L., Grimes D.J., et Colwell R.R. (1988). Growth of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* under strict anaerobic conditions – *Syst. Appl. Microb. vol 11 : 13–15.*

Zobell C.E. et Feltham C.B. (1938) Bacteria as food for certain marine invertebrates – *J. Mar. Res. vol. 1 : 312–327.*

ANNEXE 1

Milieux de culture

Méthodes de dénombrement

Vibrio cholerae

V. cholerae se trouvant en très faible concentration dans le milieu, il est absolument nécessaire d'utiliser un milieu de préenrichissement. Le plus utilisé est actuellement l'EPA (eau peptonée alcaline) avec une incubation de 6 à 18 h à 35–37°C pour les eaux continentales et 6 h à 30°C pour les échantillons d'origine marine. Ensuite est effectué un enrichissement pour les prélèvements marins avec l'EPSA (eau peptonée saline alcaline) et une incubation de 18 h à 30°C (Urdaci–Bertran, 1987).

N.B. Une nouvelle méthode décrite par De Paolo et al. (dans Janda et al., 1988) recommande une incubation de 18 h à 42°C.

De manière générale la technique de filtration sur filtres de diamètre 0,22µm préconisée par Dodin et Fournier (1992) est bien utilisée en France et permet de traiter de 500 à 1000ml d'eau de mer sans problème de colmatage ; cette membrane est alors roulée sur elle-même et placée en EPSA à 30°C.

En cas d'une présence très faible dans le milieu, un procédé de prélèvement appelé le tampon Moore, consiste en un bouchon de gaze fixé à un fil de fer et maintenu dans le courant d'eau pendant plusieurs jours ; ce bouchon est ensuite transféré sur milieu enrichi (Spira, 1984).

Une autre technique consiste à utiliser des billes de polyacrylamide aimantées sur lesquelles sont fixés des anticorps spécifiques de la fraction antigénique Ch1+2 du vibron cholérique ; ces billes sont mises en contact avec le prélèvement d'eau pendant 30mn à la température ambiante et soumises à une agitation douce. Le vibron cholérique est retenu sur ces billes qui sont alors récupérées avec un bâton aimanté et placées en culture dans l'EPSA avec une incubation de 18h à 37° (Dodin et Fournier, 1992).

Le dénombrement se fait par méthode NPP (nombre le plus probable).

Ensuite il y a ensemencement sur un milieu d'isolement avec une incubation de 12 à 18h à 30°C pour les prélèvements marins (Urdaci–Bertran, 1987) le plus utilisé étant le TCBS

(thiosulfate, citrate, bile, saccharose) sur lequel les colonies de *V. cholerae* sont jaunes. Le milieu à la gélatine taurocholate-tellurite peut également être utilisé (le tellurite est réduit par la bactérie) ainsi qu'un autre milieu qui est le sodium dodecyl sulfate polymixine B saccharose : il met en évidence la production de sulfatase alkyl par *V. cholerae* (Janda et al., 1988).

L'identification se fait à partir des colonies isolées sur gélose avec des galeries d'identification. Les isolats sont d'abord testés par rapport à la production d'oxydase. Ensuite une batterie de test permet d'identifier parfaitement la bactérie.

N.B. L'identification à partir du TCBS a l'inconvénient de donner parfois des faux oxydase (-), caractère qui permet de différencier *V. cholerae* des *Enterobacteriaceae* ; un test spécifique vient d'être mis au point par Vila et al., (1992).

Des galeries expérimentales à 99 sources de carbone (auxanogrammes) préconisées par Grimont peuvent être utilisées en complément de la batterie de tests biochimiques courants, le mélange inoculé avec la suspension bactériennes est réparti dans les cupule API et incubé à 30°C. Les résultats sont notés tous les jours jusqu'au 6ème (Urdaci-Bertran, 1987).

Le milieu VC utilisé comme multitest pour l'identification de *V. cholerae* a été mis au point par Kaper (cité par Nair et al., 1987). Il contient (en g/l) : protéose peptone : 5 - extrait de levure : 3 - tryptone : 10 - arginine hydrochloride : 5 - glucose : 1 - inositol : 10 - arabinose : 10 - Na₂S₂O₃ : 0,4 - citrate ferrique d'ammonium : 0,5 - NaCl : 0,5 - bromocrésol pourpre : 0,02 - gelose Agar : 15 (pH=6,7)

Il s'utilise après isolement de colonies typiques sur TCBS. Les tubes sont inoculés puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures, afin de déterminer les *V. cholerae* présomptifs d'après les caractères suivants : H₂S (-), production de gaz (-), indole (+) et oxydase (+).

N.B. Un complément d'identification est nécessaire si l'on veut éviter les quelques faux-positifs, et s'effectue avec la galerie Api 20E ainsi qu'avec les tests suivants : mannose et croissance sur gelose nutritive additionnée de NaCl.

Ce milieu VC est sans aucun doute un excellent milieu pour l'identification rapide des *V. cholerae* présomptifs, surtout dans les études de milieu (Nair et al., 1987).

Un nouveau milieu testé par Massad et Oliver (1987) est le CPC (cellobiose polymixine B-colistine). Utilisé après enrichissement, il remplace très avantageusement le TCBS et les galeries biochimiques : il s'appuie sur la faculté de *V. cholerae* et *V. vulnificus* de résister à la colistine et à la polymixine B à 40°C, la cellobiose permet ensuite de distinguer les deux bactéries : *V. cholerae* ne fermente pas le cellobiose et les colonies apparaissent en violet entourées de bleu en 24 à 48h. (une souche de *V. parahaemolyticus* fermente également le cellobiose à cette température). L'efficacité de ce milieu a été jugée comparable sinon meilleure que celle du TCBS. Il doit être préparé au dernier moment.

Vibrio parahaemolyticus

La méthode la plus couramment utilisée reste la méthode NPP (nombre le plus probable) sur milieu enrichi. Beaucoup de controverses sont émises sur ce dernier : bien que le milieu GSTB (glucose salt teepol broth) ait souvent été prôné (Joseph et al., 1982), de nombreux auteurs s'accordent pour considérer le milieu EPA (eau peptonée alcaline) comme le meilleur (Beuchat, Peterson, Sahazaki dans Eyles, 1985), (Dupray et al., Shiores et al., dans Sato et al., 1992 ; Eyles et al., 1986 ; Buck, 1990 ; Nair et al., 1991). Les différences constatées portent sur la quantité de sel à y intégrer, ainsi :

- Dupray et al., l'ont utilisé avec 3% de NaCl
- Shiores et al., avec 1% pour des sédiments intertidaux
- Sato et al. (1992), Buck (1990), Venkateswaran et al. (1989), avec 1% pour l'eau et les mollusques.

Eyles et al., (1985) considèrent que ce milieu est très efficace pour les germes contenus dans les produits du milieu marin, en particulier les huîtres. Seulement, il est important de jouer habilement sur la durée d'incubation ; ainsi, d'après Dupray et Cormier, des cellules de *V. parahaemolyticus* non stressées peuvent pousser très abondamment en 8 h et une incubation prolongée aboutirait à un débordement par une autre espèce bactérienne surtout dans l'EPA qui n'est pas très sélectif. Même constatation chez Eyles et al., (1985) avec l'EPA et le GSTB ; pour ces auteurs la meilleure technique serait deux enrichissements successifs avec l'EPA et 6 h d'incubation à chaque fois. L'incubation se ferait à 30°C.

D'autres milieux sont utilisés pour le dénombrement :

- SWC (eau de mer + peptone + levure + glycérol) (Greenberg et al., 1984)
- SWYE (eau de mer + proteose peptone + levure) (Kaneko et Colwell, 1978).

Ensuite il y a ensemencement sur milieu d'isolement, le plus utilisé étant le TCBS (thiosulfate, citrate, bile salt sucrose agar) sur lequel les colonies vertes sont identifiées comme des *V. parahaemolyticus* présumptives. Il est utilisé par Kaneko et Colwell (1978) pour les eaux, par Greenberg et al. (1984) pour l'eau et les bivalves du milieu avec 18 à 24 h d'incubation à 38 - 41°C, par Buck (1990) pour l'eau et par Nair et al. (1991) pour les crevettes.

NB. Les colonies de *V. alginolyticus* ne fermentant pas le saccharose, sont jaunes.

Eyles et al., (1985) ont comparé le comptage par NPP avec l' EPA et le comptage direct sur gélose TCBS. Il semble que la méthode NPP soit beaucoup plus efficace : elle donnerait jusqu' à cinq fois plus de bactéries dénombrées.

L'identification se fait à partir des colonies isolées sur gélose TCBS avec des galeries d'identification. Les isolats sont d'abord testés par rapport à la production d'oxydase, ensuite une batterie de tests permet d'identifier la bactérie d'après ses caractères biochimiques (voir 2.3).

Le milieu VP utilisé comme multitest pour l'identification de *V. parahaemolyticus* a été mis au point par Kaper et al, (1980). Il contient (en g/l) : gelysate peptone : 5 – extrait de levure : 3 – tryptone : 10 – arginine hydrochloride : 5 – sucrose : 20 – lactose : 20 – mannitol : 5 – Na₂S₂O₃ : 0,3 – citrate ferrique d'ammonium : 0,5 – bromocrésol pourpre : 0,02 – NaCl : 30 – gelose Agar : 13,5 (pH=6,7)

Il s'utilise après isolement de colonies typiques sur TCBS. Les tubes sont inoculés puis incubés à 35°C pendant 18 à 24 heures, afin de déterminer les *V. parahaemolyticus* d'après les caractères suivants : H₂S (-), production de gaz (-), indole (+), oxydase (+), mannitol (+), saccharose (-), lactose (-) et arginine (-) ; pour confirmer, on peut y ajouter la croissance sur milieu + NaCl, la croissance à 43°C et la lysine décarboxylase.

Le problème lié à ce milieu est de ne pas détecter la fermentation du mannitol si l'arginine, le sucrose ou le lactose sont fermentés: cela pose des problèmes d'identification de certaines souches de *V. parahaemolyticus* qui sont saccharose (+)

N.B. Pour de plus amples informations sur les milieux utilisés pour la détection de cette bactérie, cf. Joseph et al., (1982).

Vibrio vulnificus

La même méthode que précédemment est utilisée pour cette bactérie : milieu EPA + NaCl et dénombrement par NPP.

Pour l'isolement, on utilise également le TCBS : les colonies de *V. vulnificus* présomptives sont bleues ou vertes (saccharose (-)) ou jaunes (saccharose (+)).

Les isolats sont d'abord testés par rapport à la production d'oxydase et l'hydrolyse de la β galactosidase. Ensuite une batterie de tests permet d'identifier la bactérie. *V. vulnificus* se distingue des autres vibrios halophiles par sa capacité à fermenter le lactose et à produire la β galactosidase, elle est surnommée "vibrio lactose-positive".

D'autres méthodes sont utilisées, ce sont :

– l'ensemencement sur milieu sodium dodecyl sulfate polymixineB–saccharose qui est utilisé pour le dénombrement direct de *V. vulnificus* dans les coquillages sans passage par un milieu d'enrichissement, contrairement à *V. cholerae* (Janda et al., 1988)

– l'ensemencement sur milieu CPC (cellobiose, polymixineB–colistine) testé par Massad et Oliver (1987) à 40°C qui permet une sélection rapide et très efficace de *V. vulnificus* après enrichissement ; les colonies apparaissent en jaune entourées de jaune en 24 à 48h (voir dénombrement *V. cholerae*). Il semble que ce milieu soit excellent pour éliminer toutes les autres bactéries : les autres vibrios (sauf *V. cholerae*), les *Flavobacterium*, les *Pseudomonas* et les *Photobacterium*. Ce milieu utilisé après enrichissement avec l' EPA serait également considéré comme le plus efficace par Sloan et al. (1992).

– l'essai immunoenzymatique (EIA) mis au point par Tamplin et al. (1991) : il permet de détecter *V. vulnificus* dans l'eau, le sédiment et les huîtres ; il utilise un anticorps monoclonal spécifique d'un épitope de la bactérie, le mAb FRBT37. Le taux minimal de détection se situe à 2000 cellules et la réaction atteint son intensité maximale pour 10^6 cellules dans la plaque de microdilution du kit EIA (Boeringer). Les auteurs, ayant travaillé dans les zones tempérées de la côte Est des USA, préconisent l'utilisation de cette méthode directement après enrichissement à l'EPA durant les mois de mars, avril et mai ; à partir du mois de juin ils conseillent un ensemencement intermédiaire sur CPC de la manière suivante :

- * incubation sur EPA à 35°C pendant 12 à 16 h
- * ensemencement des tubes troubles sur CPC modifié (colistine méthanosulfate) et incubation à 40°C pendant 10 à 24 h.
- * transfert des *V. vulnificus* présomptives sur EPA et incubation à 35°C pendant 4 à 6h jusqu' à obtention du trouble
- * test final avec l' EIA

Les réactions de l'EIA sont similaires pour les colonies opaques et les colonies translucides. Cette technique EIA + CPC + NPP a été utilisée par Vanoy et al. (1992) dans leurs études du milieu en Baie de Galveston (Floride, Golfe de Mexico).

– L'agglutination par un sérum spécifique antiflagellaire anti H peut aussi être utilisé (Kaysner et al., 1987) ou encore la méthode rapide de Siebeling et Simonson (1990) utilisant des cellules de staphylocoques dorés + anticorps spécifiques anti H sur billes de latex.

Taxonomie

Vibrio cholerae – *Vibrio parahaemolyticus* – *Vibrio vulnificus*

Aux méthodes d'identification précédemment décrites s'ajoutent un certain nombre de méthodes "modernes" qui permettent de résoudre des problèmes d'identification difficile :

- l'identification et la quantification des acides gras cellulaires des souches de *Vibrionaceae* par chromatographie en phase gazeuse
- l'étude des antigènes totaux des bactéries par une technique de co-agglutination, les anticorps totaux étant obtenus au préalable par la technique d'hyperimmunisation des lapins
- les hybridations ADN/ADN par la méthode de la nucléase S1 et l'acide trichloracétique donnant un % d'homologie entre les souches bactériennes étudiées.
- l'étude de profils de restriction des gènes codant pour les ARN_r. En effet ceux-ci ont l'avantage d'être représentés en plusieurs copies dans le chromosome de la bactérie, on peut donc observer plusieurs fragments possédant les séquences des gènes ARN_r et cette information diffère d'une espèce bactérienne à l'autre.

N.B. Ces techniques sont très bien exposées et détaillées dans la thèse de Urdaci-Bertran (1987)

Sérotypage – Sérogroupage – Biotypage

Vibrio cholerae

La séparation des sérogroupes *O1* et *non O1* s'effectue par la technique d'agglutination sur sérum immun de lapin : les billes de polyacrylamide (décrites précédemment) sur lesquelles ont été fixés les anticorps spécifiques peuvent également être déposées sur gélose de Mueller-Hinton et incubées à 37°C pendant 18h. La culture en pastille obtenue sera alors étudiée par la méthode de double diffusion : les bactéries qui ont poussé en nappe sont lysées avec une goutte de toluène pour permettre la diffusion des antigènes du vibron cholérique, un puits autour de la pastille est alors creusé avec colmatage du fond du puits par une goutte de gélose, dans ce puits est déposé le sérum anti Ch1+2. Ensuite, la boîte est placée dans une chambre humide à température ambiante ou à 4°C. Les souches de vibron cholérique donnent alors un arc de précipitation spécifique (Dodin et Fournier, 1992).

Les caractéristiques biochimiques peuvent être complétées par un sérotypage : par exemple la distinction entre les sérotypes de *V. cholerae* O1 (Inaba, Ogawa et Hikojima) est obtenue par des anticorps monoclonaux spécifiques testés par agglutination sur latex (Janda et al., 1988).

Certaines réactions permettent également de distinguer les biotypes "*classique*" et *El Tor*. Ainsi, d'après Baumann et al. (1984) et Dodin et Fournier (1992) :

Caractéristiques	"classique"	<i>El Tor</i>
lyse des hématies de mouton	-	+
Voges-Proskauer	-(+)	+
agglutination des hématies de poulet	-	+
sensibilité à la polymixine B	+	-
profils de restriction des gènes codant pour l'ARN _r	4	13

Vibrio parahaemolyticus

Des méthodes d'enrichissement immunomagnétique permettant de séparer tous les sérotypes K de la bactérie, ont été mises au point par Tomoyasu (1992).

Le phénomène Kanagawa est généralement testé sur l'agar Wagatsuma de Sahazaki. Ce milieu contient (en g/l) : - extrait de levure : 3 - peptone Bacto (Difco) : 10 - NaCl : 70 - D mannitol : 10 - KH₂PO₄ : 5 - cristal violet : 0,001 - agar : 15. Le pH est ajusté à 8 et il y est ajouté une suspension saline d'érythrocytes humains lavés, à une concentration finale de 5%. (dans certains cas, on utilise du sang de mouton)

Après inoculation de la bactérie dans ce milieu, l'incubation s'effectue à 37°C pendant 20 à 24 heures. Les souches produisant une zone de βhémolyse sont KP (+) (Baumann et al., 1984)

Vibrio vulnificus

Le sérotypage se fait par des tests d'agglutination sur des antisérums anti O. Il faut chauffer les cultures à 100°C pendant 2 heures (*V. vulnificus* ne s'agglutine pas à l'état vivant), les laver deux fois sur milieu d'infusion + 1% NaCl puis les laisser en milieu salé après centrifugation. L'incubation se fait à 35°C pendant 18h (Shimada et Sakazaki, 1984).

Virulence

Vibrio cholerae

Une nouvelle approche due à la biologie moléculaire permet de déterminer la virulence des souches. Ainsi pour *V. cholerae* O1, une détection immunologique de la toxine cholérique par le test Elisa -GM1 (Urdaci et al., 1988) peut s'ajouter à la recherche du gène codant pour cette toxine effectuée grâce à des sondes à ADN marquées au P³² (Maniatis et al., dans Urdaci et al., 1988).

Le pouvoir de virulence de *V. cholerae non O1* est également étudié : ainsi Pal et al., (1992) ont mis au point une sonde permettant la mise en évidence de la séquence nucléotidique des gènes de la toxine NAG-ST, permettant ainsi de ne plus la confondre avec celle d' *E. coli* et assurant un meilleur diagnostic qu'avec des tests souris (les interférences avec d'autres toxines, par exemple celle de *ET* sont fréquentes dans ces tests).

Vibrio parahaemolyticus

- Pour les études de milieu et les études cliniques, des sondes génétiques marquées au ³²P sont utilisées pour repérer les gènes responsables de la production de cytotoxine-hémolysine. Leur inconvénient est de ne pas donner le degré de virulence. (Kaysner et al., 1987).

Méthodes de dénombrement des bactéries viables non cultivables

Vibrio cholerae

La découverte des bactéries viables mais non cultivables a nécessité la mise en oeuvre de méthodes nouvelles. La méthode courante (NPP + TCBS + tests d'identification) est inadéquate et l'on doit utiliser des méthodes directes :

- la méthode DVC (direct viable count) de Kogure et al., (1979) utilisant le microscope à épifluorescence pour compter le nombre de cellules viables ; elle est généralement couplée avec un comptage direct à l'acridine orange (AODC) pour dénombrer le nombre total de cellules (Rivera et al., 1989).

- la méthode directe avec comptage sous microscope à épifluorescence avec marquage par anticorps fluorescents ; elle est souvent couplée avec la méthode NPP sur milieu enrichi pour un dénombrement total. (Xu et al., 1982 ; Colwell et al., 1985)

Vibrio parahaemolyticus

(voir méthodes utilisées pour *V. cholerae*)

Vibrio vulnificus

(voir méthodes utilisées pour *V. cholerae*)

La méthode DVC peut être couplée à la méthode INT violet (p.iodonitrotetrazolium) avec un examen sous lumière blanche permettant de compter le nombre de précipités d'INT formazan correspondant à des cellules qui respirent et qui sont donc actives (Wolf et Oliver, 1992). Cette méthode est couplée avec un comptage direct à l'acridine orange pour dénombrer le nombre total de cellules

GLOSSAIRE

acides nucléiques : *ADN* et *ARN*.

acridine orange : colorant fluorescent vital qui s'intercale entre les *acides nucléiques*. Les **noyaux** des cellules colorées apparaissent en vert fluo tandis que l'*ARN* cytoplasmique apparaît en orangé.

adhésines : terme général donné à des molécules impliquées dans l'adhésion. En microbiologie, ce sont des composants de surface bactériens.

ADN ou acide désoxyribonucléique : principal matériel génétique de toutes les cellules, localisé dans les chromosomes et support matériel de l'hérédité. Il fonctionne comme un dépositaire stable de l'information génétique.

aggrégation : processus d'adhésion entre des cellules. C'est un phénomène très lent par rapport à l'agglutination.

anaérobiose : condition nécessaire à la vie de microorganismes dont le métabolisme peut s'effectuer en absence d'oxygène (anaérobiose facultative) ou est inhibé par la présence d'oxygène (anaérobiose stricte).

ARN ou acide ribonucléique : matériel génétique qui fonctionne comme un intermédiaire informel (ARN messenger) ou un transporteur d'acides aminés (ARN de transfert) ou quelquefois comme une enzyme. Dans certains virus, il a la même fonction que l'*ADN*.

ATP ou acide adénosine triphosphorique : il joue un rôle capital comme transporteur de radicaux phosphorylés et d'énergie dans les processus métaboliques.

Arthropode : embranchement du règne animal comportant entre autres les crustacés et les insectes (sous-embranchement des *Antennates*).

autotrophe : qualifie des organismes qui synthétisent leurs molécules organiques à partir de composés carbonés inorganiques (dioxide de carbone, bicarbonate ou carbonate).

bactériocine : protéine antibiotique élaborée par certaines bactéries dont le rôle est de tuer d'autres bactéries possédant le récepteur spécifique de cette protéine. Des analogies existent

entre bactériocine et *bactériophage*, car les mêmes agents physiques et chimiques induisent leur action, cependant fondamentalement, ils sont différents car les bactériocines ne comportent pas d'*acides nucléiques*. Les bactériocines actives sur les vibrios sont les vibriocines.

bactériophage ou phage : virus spécifique d'une espèce bactérienne donnée, qui se fixe et pénètre dans une bactérie, détourne à son profit le métabolisme de la bactérie, l'oblige à édifier son propre *ADN* et à fabriquer des centaines de phages identiques qui seront libérés à la lyse de la bactérie. Certaines souches bactériennes ne se lysent pas et intègrent alors le phage à leur reproduction normale.

bdellovibrio : bactérie qui possède la propriété de pénétrer dans certaines autres espèces bactériennes et de provoquer leur lyse, comme le fait un *bactériophage*.

bioluminescence : lumière produite par un organisme vivant. La molécule qui émet la lumière est naturelle.

bivalve déposivore : bivalve filtreur se nourrissant grâce à la matière organique présente à la surface du sédiment dans lequel il est enterré. Le balayage de cette surface est une véritable aspiration effectuée grâce au siphon inhalant. Les tellines seraient déposivores.

bivalve suspensivore : bivalve filtreur se nourrissant grâce à la matière organique présente dans la colonne d'eau. Quelques déposivores peuvent être également suspensivores s'ils se nourrissent de dépôts remis en suspension dans l'eau ... Les moules, les huîtres et les palourdes seraient suspensivores

chimiorécepteur : cellule ou groupe de cellules spécialisé(e) dans la réponse à des substances chimiques présentes dans l'environnement.

chimiotactisme : perception et mouvement de cellules vers (ou loin) d'un agent chimique particulier

chitine : polymère glucidique ayant un rôle structural. Associé à des sels minéraux et à des protéines, il soutient la cuticule des *Arthropodes* (exosquelette), lui donnant sa dureté, sa solidité et son imperméabilité. On la rencontre également dans les soies des annélides, les dents de la radula des gastéropodes et le tissu de certains champignons et lichens.

chitinase : enzyme catalysant la dégradation de la *chitine*.

cirres (ou cils eu-latéro-frontaux dans Grasse, 1960) : cils appartenant au groupe des latéro-frontaux (par opposition aux frontaux) dans lequel ils s'associent aux cils prolatéro-frontaux. Tous ces cils, groupés en touffes, se situent sur les filaments des feuillets branchiaux des bivalves en particulier. Les cirres sont spécialisés dans le tamisage des particules passant à travers les branchies.

collagénase : enzyme protéolytique capable de détruire le collagène (protéine fibreuse présente dans le tissu conjonctif). Lorsque la cassure initiale est faite, des *protéases* moins spécifiques vont achever la dégradation.

cytolysines : terme général donné aux substances qui ont la propriété de dissoudre les cellules des tissus. Elles appartiennent plus généralement aux lysines.

cytotoxines : toxines d'origine cellulaire attaquant sélectivement certaines cellules.

électronégativité : aptitude que possède un atome pour fixer des électrons dans une liaison avec un autre atome. Les éléments électronégatifs se déposent à l'anode lors d'une électrolyse.

endospore : spore endogène.

endotoxines : substances intracellulaires stables à la chaleur qui ne sont pas excrétées (contrairement à l'*exotoxine*), elle font partie de la membrane extérieure de la paroi bactérienne des bactéries *gram(-)* et sont responsables de la plupart des effets virulents des ces bactéries.

Enterobactériaceae : grande famille de bactéries *gram (-)* qui occupent l'intestin des mammifères. La plus commune est *Escherichia coli*. La plupart de ces bactéries sont commensales et sans danger, mais d'autres peuvent provoquer des maladies intestinales (ex. *Shigella*, *Salmonella*)

entérotoxine : *exotoxine* bactérienne produite par les *Entérobactériaceae* (ou bactéries proches), il s'agit du LPS de la membrane externe. (voir Tab. 1) Cette toxine agit sur la muqueuse intestinale en perturbant les systèmes de transport des ions et de l'eau, elle induit alors des diarrhées.

érythrocytes : terme générique pour désigner les globules rouges des vertébrés.

espace périplasmique : espace non structuré situé entre la paroi cellulaire et la membrane ~~externe~~ des bactéries **gram (-)**.

exotoxines : substances relâchées par des bactéries **gram(+)** ou **gram(-)**, qui diffusent dans le milieu extérieur. Leur action est probablement indirecte : en effet, leur contact avec un substrat de l'organisme permettrait la formation d'un corps toxique. Elles sont habituellement spécifiques et fortement toxiques (ex : toxine cholérique ou toxine diphtérique). Dans le groupe des exotoxines, on peut distinguer les neurotoxines, les dermatoxines, les **entérotoxines**, les **hémolysines**.

exuvie : ancienne cuticule rejetée à l'occasion de chaque mue chez les *Arthropodes*.

facteur limitant : facteur fixant l'extension d'une communauté, le niveau de productivité d'un écosystème ou déterminant la présence d'une espèce et la croissance des individus. Un facteur écologique peut devenir limitant aussi bien par défaut que par excès.

génome : la totalité des gènes portés par un individu ou une cellule.

glucose : sucre à six carbones rencontré très largement dans les plantes et les animaux. Sa cassure est une source majeure d'énergie pour le métabolisme.

gram (-) : bactéries ne retenant pas la coloration de Gram au violet de Gentiane. Elles sont alors roses. Ces bactéries ont une paroi cellulaire mince.

gram (+) : bactéries retenant la coloration de Gram au violet de Gentiane. Elles sont alors violettes. Elles ont une paroi cellulaire épaisse.

halophile : littéralement, qui aime le sel. Capable de survivre dans des milieux ayant une forte charge en ions comme les lacs salés.

hémagglutinine : substance qui provoque l'agglutination des globules rouges.

hémolysine : **exotoxine** bactérienne dont l'action est la lyse des globules rouges et donc la perte d'hémoglobine à travers la membrane endommagée. Elle appartient plus généralement au groupe des lysines.

hydrolyse : clivage d'une molécule en deux ou plusieurs molécules plus petites, par réaction avec l'eau.

hydrophobe : se dit de molécules ou de groupements non polaires qui sont insolubles dans l'eau.

jonctions de Bayer : sites d'adhésion entre la *membrane cytoplasmique* et la membrane externe des bactéries *gram (-)* ; chaque cellule peut en posséder de 200 à 400.

leucocytes : terme générique utilisé pour désigner les globules blancs

lipases : enzymes chargées de la dégradation des lipides, en particulier les mono, di ou triglycérides.. Les ions Ca^{++} sont généralement utilisés dans cette réaction. Les lipases appartiennent plus généralement au groupe des estérases.

luciférase : enzyme propre aux animaux lumineux (ex. la luciole) qui catalyse la production de la lumière dans la réaction entre une molécule, la luciférine, et l'*ATP*. Cette réaction se passe dans des conditions d'économie énergétique dont aucune source lumineuse ne s'approche.

macrophages : cellules *phagocytaires* dérivées du monocyte (cellule sanguine) qui réagissent à l'approche de matériel étranger. Ils jouent un rôle important en détruisant des bactéries ou des protozoaires. Ils relâchent des substances qui stimulent entre autres les cellules du système immunitaire.

membrane cytoplasmique (ou plasmique) : membrane enveloppant les cellules, animales ou végétales ; son rôle est de contrôler tous les échanges d'eau et de substances dissoutes.

microcyste : spore de résistance.

monosaccharide : sucre simple qui ne peut pas être hydrolysé en plusieurs petites unités.

mucinase : enzyme intestinale catalysant spécifiquement la dégradation par coagulation de la *mucine*.

mucine : glycoprotéine présente dans les liquides de sécrétion , son rôle est de les lubrifier.

neuraminidase : enzyme qui catalyse le clivage de certains constituants essentiels des glycoprotéines des membranes cellulaires, en libérant l'acide neuraminique.

noyau : organe central et vital de toute cellule vivante, séparé du reste de la cellule par une membrane nucléaire. Le noyau contient les chromosomes.

ose : glucide ne comportant qu'une seule chaîne carbonée sans ramification.

pathogène opportuniste ou occasionnellement pathogène : organisme pathogène qui est souvent commensal, mais qui peut donner naissance à l'infection lorsque son hôte est immuno dépressur.

phagocytose : captage de particules ou de microorganismes par une cellule appelé phagocyte (ex. *macrophage*)

phosphatases : enzymes catalysant l'hydrolyse des phosphomonoesters. Ce groupe comprend une grande quantité d'enzymes.

phospholipases : enzymes catalysant l'hydrolyse des esters des *phospholipides*. Plusieurs fractions sont décrites : A1, A2, B, C, et D. La phospholipase C serait chez certaines bactéries pathogènes un produit de sécrétion fortement toxique.

phospholipides : lipides complexes renfermant du phosphore. Ils se trouvent surtout dans la *membrane cytoplasmique*.

pili : ils facilitent l'adhésion de la bactérie sur des récepteurs des cellules épithéliales de l'intestin. Ils sont souvent référencés comme des facteurs de colonisation ou facteurs d'adhérence. Les antigènes des pili peuvent être essentiels dans la virulence et servir dans la transmission des *plasmides*.

plasmide : *ADN* circulaire se trouvant en excès du génome normal de la bactérie, qui peut être transmis à une autre cellule sous deux formes : en tant qu'entité indépendante intracytoplasmique ou après insertion dans le *génom*e de l'hôte.

polysaccharide ou polyside : glucide formé de l'union de plusieurs *oses* (ex. amidon, glycogène, cellulose ...)

pompe à sodium ou sodium-potassium ATPase : enzyme de la *membrane cytoplasmique* qui transporte trois ions Na^+ hors de la cellule et deux ions K^+ à l'intérieur, ceci pour chaque molécule d'*ATP* hydrolysé. Le gradient de sodium ainsi établi est alors utilisé dans plusieurs

but : transport passif de substances à travers la membrane et induction de différences de potentiel à la surface de cette membrane, servant à divers mécanismes.

préférendum : valeur d'un facteur physique ou chimique de l'environnement (température, humidité, luminosité ...) pour laquelle les individus d'une espèce manifestant une préférence par leur orientation, leurs déplacements, leur croissance

protéases ou peptidases : en général ce sont des enzymes digestives ou des enzymes d'origine botanique ou bactérienne qui ont une action sur l'activation ou la dégradation des protéines. Certaines protéases auraient une action sur certaines **bactériocines**.

pseudofécès : matériel particulaire qui est rejeté par le coquillage avant ingestion. Les pseudofécès apparaissent à partir d'un certain seuil de concentration en particules dans l'eau. Dans la plupart des bivalves, les pseudofécès s'accumulent à la base de l'ouverture inhalante et sont rejetés périodiquement soit à travers cette ouverture soit par le siphon, grâce à une contraction soudaine des muscles adducteurs. Le mécanisme est particulièrement bien développé chez les déposivores.

Salmonella : genre d' *Entérobacteriaceae*, mobile, **gram (-)**. Si elle est invasive, elle cause alors une fièvre entérique (typhoïde avec *S. typhi*), si elle n'est pas invasive, elle cause alors une intoxication alimentaire (*S. typhimurium* ou *S. enteridis*).

Shigella : genre d' *Enterobactériaceae*, non mobile, **gram (-)** ; elle cause la dysenterie.

sidérophores : composés naturels fixant le fer par chélation, le résultat final donnant des hydroxides colloïdaux insolubles à pH neutre et inaccessibles. Ce sont des transporteurs du fer.

temps de génération : temps nécessaire à une population pour doubler. Il correspond à la longueur moyenne d'un cycle de divisions cellulaires.

transduction généralisée : phénomène par lequel un virus (ou un **phage**) peut permettre un échange génétique entre deux cellules bactériennes par captage d'un fragment de chromosome d'une bactérie lysée et introduction dans une autre bactérie.

UFC ou Unité Formant Colonie : c'est la bactérie et elle seule, donnant naissance à une colonie et une seule. (L'isolement des colonies doit être correct). La bactérie qui est incapable de former une colonie est alors dite "non viable".

ERRATUM

p. 40

c'est une bactérie qui tolère des salinités de 0,8 à 34 g/l.

p.78

espace périplasmique : espace non structuré situé entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique des bactéries gram (-)