

Implantation et survie de *Campylobacter jejuni/coli* chez la moule *Mytilus edulis*

Campylobacter jejuni/coli uptake and survival by mussels Mytilus edulis

JACQUES MINET, FRANÇOISE SAUVAGER, MICHEL CORMIER

Laboratoire de microbiologie, Faculté de pharmacie, Université de Rennes I
2 avenue du Professeur Léon-Bernard, 35043 Rennes Cedex, France

Résumé

Les capacités de survie, dans de l'eau de mer et des moules contaminées, de *Campylobacter jejuni/coli* et *Salmonella typhimurium* sont évaluées par cultures bactériennes et dénombrements directs (en immunofluorescence) des bactéries viables (incorporant les substrats). Des moules (*Mytilus edulis*) contaminées au laboratoire par *C. jejuni/coli* et *S. typhimurium* en présence d'algues unicellulaires (*Tetraselmis suecica*) accumulent efficacement ces microorganismes dans leur tractus digestif (100 à 500 fois les taux des bacs de contamination). Les moules ainsi contaminées sont conservées une semaine au sec à 16 °C. Dans l'intestin, pendant ce délai, *S. typhimurium* persiste en nombre constant de bactéries cultivables ; *C. jejuni* persiste en nombre constant de bactéries viables mais le nombre de bactéries cultivables est diminué par 10 000.

Le risque qu'une contamination de moules par *Campylobacter* survienne apparaît négligeable par rapport à celui représenté par *Salmonella* : dans l'eau de mer, la survie de *Campylobacter* est très inférieure (jusqu'à 10⁶ fois moindre après une semaine) à celle de *Salmonella*. Cependant, les *Campylobacter* conservent pendant au moins 6 jours en eau de mer et dans les moules leurs facteurs de virulence (mobilité et capacité d'adhésion). Le risque de campylobactériose secondaire à l'ingestion de coquillages apparaît, au total, plausible bien que de faible probabilité.

Abstract

Illnesses due to marine bivalvia consumption are mostly associated with viruses as causative agents. In more than the half of cases, this agent remains unidentified, nevertheless. So far as bacteria are concerned, *Salmonella* are found firstly. *Campylobacters* represent a major cause of gastrointestinal disease, with *Salmonella*, among humans. Whether campylobacteriosis may be acquired from shellfishes remains unclear.

We undertook to comparatively appreciate the survival of *Campylobacter jejuni/coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater and contaminated mussels. Bacterial enumerations were performed using microbial cultures and specific (with immunofluorescence) direct viable counts (of substrate responsive bacteria). During laboratory contamination experiments, *C. jejuni/coli* and *S. typhimurium* are afforded together with unicellular microalgae *Tetraselmis suecica*. Mussels incorporate efficiently these microorganisms into their digestive tract (up 100 to 500 folds the concentration of contamination tank). In the gut of contaminated mussels, stored dry at 16°C, the number of culturable *Salmonella* remains constant after one week whereas *C. jejuni* persists in constant number of viable cells but exhibits a 10000 fold decrease of culturable bacteria.

In seawater, *Campylobacter* survive poorly, compared with *Salmonella*: from comparable initial densities, the difference may reach a 10⁶ factor after one week. The occurrence of

mussel contamination with *Salmonella* is customary in polluted seawater: it should remain neglectible with *Campylobacter*.

The cells of *C. coli* which survived after a 6 days stay into seawater and mussels maintained intact virulence factors: mobility and adherence to cultured HeLa cells. This is at least true for bacteria remaining culturable, and questionable for viable non culturable cells. On the whole, shellfish born diseases due to *Campylobacter* should actually be possible (Griffin *et al.*, 1983). This would nevertheless represent a low probability because *Campylobacter* survive slenderly in seawater.

INTRODUCTION

En France pendant l'année 1990, les produits de la mer ont été incriminés dans 29 des 225 cas de toxi-infections alimentaires collectives pour lesquels l'aliment en cause avait pu être retrouvé (Pignault *et al.*, 1991) ; six fois, il s'est agi d'une salmonellose. Les affections bactériennes apparaissent minoritaires, comparées aux viroses (Schwartzbrod *et al.*, 1991) ou aux effets des toxines de dinoflagellés (Poggi et Berthomé, 1987), parmi les maladies liées à la consommation de bivalves ; l'agent responsable peut cependant demeurer indéterminé dans plus de la moitié des cas selon certaines études (Anonyme, 1989). La question se pose alors de savoir si certaines bactéries encore peu souvent recherchées ne pourraient pas contribuer à diminuer cette part d'inconnu. Les *Campylobacter* des espèces *C. jejuni* et *C. coli* représentent un groupe de bactéries entéropathogènes dont les réservoirs de germes et les modes de transmission rappellent ceux des *Salmonella sp.* (Blaser *et al.*, 1984). La morbidité des deux affections peut également être considérée comme comparable : les *Campylobacter* précèdent les salmonelles, au premier rang des bactéries entéropathogènes, en Grande-Bretagne et viennent au second rang dans les autres pays (Megraud et Latrille, 1981). Ainsi, dans 10 hôpitaux français qui recherchaient systématiquement les deux espèces, 318 souches de *Salmonella sp.* et 275 souches de *Campylobacter sp.* ont été isolées en 1987 (Megraud, 1987). Il faut toutefois considérer que si la recherche de salmonelles dans les coprocultures est, en France, systématique et ne pose que peu de problèmes de fiabilité, il en a été longtemps autrement pour le genre *Campylobacter* dont l'importance n'a été soulignée que plus récemment. La présence de *Campylobacter sp.* dans les eaux de rivière, corrélée à la présence de marqueurs de contamination fécale, est un fait constant bien établi (Bolton *et al.*, 1987 ; Martikainen *et al.*, 1990). A partir des rivières et des égouts, peut survenir une contamination des eaux saumâtres et des estuaires par des *Campylobacter* (Knill *et al.*, 1978 ; Blaser *et al.*, 1984). Des souches de *Campylobacter jejuni/coli* ont parfois été isolées de moules (Trollope, 1984) et d'huîtres (Arumugaswamy et Proudford, 1987). En 1983, Griffin *et al.* ont étudié un cas de toxi-infection alimentaire collective dans lequel *C. jejuni* peut être impliqué, associé à la consommation de clams crus. Ce cas constitue à notre connaissance la seule publication à ce jour rapportant un cas de campylobactériose humaine secondaire à la consommation de bivalves marins. Nous avons entrepris d'évaluer de façon comparative le devenir, en eau de mer et dans des moules contaminées, de bactéries des genres *Campylobacter* et *Salmonella*. Ces dernières représentent en effet, parmi les maladies bactériennes transmises par les coquillages, l'agent le moins rare et le mieux étudié. Afin d'apprécier la présence de bactéries viables non culti-

vables (Roszack *et al.*, 1984 ; Rollins et Colwell, 1986) les dénombrements bactériens ont été effectués, au cours de ce travail, successivement par cultures et par la technique du « Direct Viable Count » (DVC) décrite par Kogure *et al.* en 1979, modifiée et optimisée en fonction de travaux précédents (Singh *et al.*, 1989 et 1990 ; Desmots *et al.*, 1992).

Matériels et méthodes

Campylobacter jejuni 86233, *Campylobacter coli* 93 et *Salmonella typhimurium* LEL sont des isolats cliniques à partir de selles de malades.

Algues unicellulaires : *Tetraselmis suecica* est cultivée en eau de mer naturelle autoclavée supplémentée par 1 ‰ d'Hydrokani C₂^R (Norskhydro Azote, Neuilly-sur-Seine).

Préparation des inoculums : Des cultures en bouillon *Brucella* incubés 18 heures à 37 °C (*Salmonella*) ou 36 heures à 42 °C en atmosphère microaéro-ophile (*Campylobacter*) sont lavées 2 fois en tampon phosphate isotonique pH7, 6 (PBS) par centrifugation (10 mn à 4 000 g). Les culots obtenus sont dilués en eau de mer passée sur un filtre de porosité 0,22 µm. La densité de l'inoculum est adaptée par dilution appropriée et contrôlée par coloration directe à l'acridine orange puis mis en cultures. On réalise un inoculum mixte contenant environ 10⁸ cellules/ml de chacune des espèces. Pour ensemercer le bac de contamination des moules, 40 ml d'inoculum mixte sont mélangés à environ 2 litres de culture de *T. suecica*, de façon à obtenir une concentration finale dans le bac de 10⁴ cellules/ml d'algues unicellulaires et de 10⁵ bactéries/ml environ.

Étude de la survie de *C. jejuni* 86233 et *S. typhimurium* en eau de mer : Un touril de 10 litres d'eau de mer naturelle non agitée et non aérée, placé à 16 °C, reçoit 10 ml d'inoculum mixte, sans adjonction d'algues unicellulaires.

Moules : proviennent de captage naturel, conservées par lots de 15 individus en aquarium de stockage quelques jours avant utilisation.

Contamination des moules : Le bac de contamination, d'un volume utile de 40 litres d'eau de mer, et équipé de bullage est placé à 16 °C. Les paniers de moules sont placés dans le bac de contamination ; on les y laisse une heure avant contamination. Les moules sont maintenues dans l'eau contaminée pendant 3 heures. Le bac est conservé en l'état, bullage arrêté. Le volume en est reconstitué lorsque nécessaire (évaporation) par un apport d'eau distillée.

Moules conservées au sec : Après contamination, les paniers de moules sont conservés en l'état à 16 °C.

Préparation des échantillons pour dénombrements bactériens : Les analyses de l'eau de mer sont effectuées à partir d'aliquotes recueillies par filtration sur membranes. Les moules de chaque lot sont séparées par section des byssus puis brossées sous eau courante et ouvertes à l'aide d'une lame passée à l'alcool et flambée. L'eau intervalvaire est recueillie, le manteau, les branchies, l'intestin postérieur et la glande digestive sont isolés par dissection et homogénéisés à l'Ultraturrax en bouillon *Brucella*.

Dénombrements bactériens directs sur milieu gélosé : Les milieux sont ensemençés par étalement au rateau des échantillons et de leur dilution ou

dépôt à leur surface d'une membrane filtrante. Nous avons employé la gélose Hektoën (AES Laboratoires, Combourg, France) pour les numérations de salmonelles et le milieu sélectif au charbon selon Karmali (AES Laboratoires) pour les numérations de *Campylobacter*.

Dénombrements bactériens par la technique du nombre le plus probable (NPP) : Nous avons utilisé la technique en 3 tubes (Oblinger et Koburger, 1975) interprétée par les tables de la Food and Drug Administration (1978). Pour les dénombrements de salmonelles, un filtre ou l'échantillon ou sa dilution est placé dans un volume d'eau peptonée égal à 10 fois la masse ou le volume d'échantillon qu'il représente. Le tout est incubé 2 heures à 25 °C puis 15 à 20 heures à 37 °C. Une aliquote de 0,4 ml est alors transférée dans 40 ml de bouillon de Rappaport (AES Laboratoires) incubé à 43 °C pendant 24 à 36 heures. Un volume de 10 µl de chaque tube est ensemencé en isolement sur gélose Hektoën incubée à 37 °C pendant 48 heures. Pour le dénombrement de *Campylobacter*, un filtre ou l'échantillon ou sa dilution est dilué à 10 fois en bouillon *Brucella* additionné de pyruvate de sodium (6 g.l⁻¹), métabisulfite de sodium (500 mg.l⁻¹) sang de cheval conservé à - 30 °C et décongelé extemporanément (2,5 %), et mélange sélectif de Skirrow (vancomycine 100 mg.l⁻¹, lactate de triméthoprim 5mg.l⁻¹ et polymixine B 2500 UI.l⁻¹). Après une première incubation de 4 à 6 heures à 37 °C, on rajoute à chaque bouillon 1 % d'une solution d'aztréonam (AZACTAM® Laboratoires Bristol-Meyer-Squibb) à 3,2 g.l⁻¹ et l'incubation est poursuivie à 42 °C pendant 48 heures. Un volume de 10 µl de chaque tube est ensemencé en isolement sur milieu de Karmali, incubé à 42 °C pendant 72 heures.

Milieus pour DVC :

i - Milieu pour DVC de Salmonella : Extrait de levure (250 mg), acide nalidixique (12,5 mg) et PBS (Q.S. 1000 ml).

ii - Milieu pour DVC de Campylobacter : Extrait de levure (250 mg) métabisulfite de sodium (250 mg), pyruvate de sodium (6 g), acide nalidixique (10 mg) et PBS (Q.S. 1000 ml).

Dénombrements par DVC : Réalisés sur filtre et révélés par immunofluorescence selon des protocoles décrits précédemment (Desmots *et al.*, 1990 ; Minet, 1991 ; Desmots *et al.*, 1992). Brièvement, les échantillons sont filtrés à travers des membranes Nucléopore noires, déposées en boîte de Pétri sur une couche de papier filtre imbibée de milieu pour DVC. Après incubation 6 heures à 37 °C pour les salmonelles et 12 heures à 42 °C en atmosphère microaérophile pour les *Campylobacter*, la coloration par immunofluorescence est réalisée en utilisant l'anticorps polyclonal anti-*Salmonella* polyvalent I Behring adsorbé (Desmots *et al.*, 1990) et un anticorps polyclonal adsorbé dirigé contre le lipopolysaccharide de *Campylobacter jejuni* 86233 préparé au laboratoire (Minet, 1991). La fixation des anticorps spécifiques sur les corps bactériens est révélée par un anticorps anti-IgG de lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Sigma, F.1262) en présence de bleu d'Evans. Les bactéries allongées (viabiles) sont dénombrées par observation au microscope équipé d'un éclairage ultraviolet en épifluorescence (figures 1 et 2).

Dénombrement des algues unicellulaires : Les cellules de *T. suecica* sont aisément reconnues sur les filtres colorés grâce au bleu d'Evans. Les dénombrements de *Tetraselmis* sur les filtres utilisés pour les DVC de *Salmonella* d'une part et de *Campylobacter* d'autre part constituent un contrôle interne permettant de vérifier que les échantillonnages sont effectivement comparables au cours d'une même expérience.

Test d'association aux cellules HeLa en culture : Les capacités d'adhésion de *C. coli* 93 et *C. jejuni* 86233 ont été évaluées selon la méthodologie décrite par Fauchère *et al.* (1986) selon la méthodologie suivante :

i - Cellules HeLa : La lignée continue HeLa 229 (Eurobio) est maintenue en milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle (MEM) supplémenté par 2 % de sérum de veau fœtal (SVF), 200 UI.ml⁻¹ de pénicilline G et 50 µg.ml⁻¹ de gentamicine. Les cultures sont incubées à 37 °C en atmosphère à 5 % de CO₂. Après trypsinisation du tapis cellulaire, la suspension est ajustée à 10⁵ cellules . ml⁻¹ en MEM + antibiotiques et SVF (10 %). Des plaques de 24 puits (16 mm de diamètre) contenant chacun une lamelle circulaire de verre sont inoculées par 1 ml de suspension, incubées 24 heures à 37 °C en atmosphère microaérophile puis lavées 3 fois en MEM non supplémenté, 2 heures avant de recevoir l'inoculum bactérien. Chaque puits reçoit après lavage 1 ml de MEM non supplémenté et la plaque est réincubée à 37 °C-en atmosphère microaérophile.

ii - Cultures bactériennes : Chaque souche est cultivée en bouillon *Brucella* à 37 °C pendant 24 heures pour *Salmonella typhimurium*, et 42 °C pendant 48 heures pour *Campylobacter*. Des culots bactériens sont préparés et lavés en MEM par centrifugation (500 g pendant 30 mm) ; les inoculums sont ajustés en MEM à environ 10⁸ bactéries.ml⁻¹.

iii - Test d'association : Chaque inoculum est testé en triplicat à raison de 1 ml par puits. Les plaques sont laissées 3 heures à 37 °C en atmosphère microaérophile, lavées 5 fois en MEM, et réincubées 3 heures dans les mêmes conditions puis lavées finalement 10 fois en MEM. Les lamelles sont alors fixées 5 mn dans du méthanol à 4 °C, séchées, colorées par l'acridine orange et observées en lumière ultraviolette en épifluorescence. On calcule alors l'index d'association (IA) :

$IA = \sum(Nxb)/N$ où N cellules sont associées à b bactéries, pour un total de 150 à 250 cellules par test.

La souche est associative si $IA \geq 2$.

Résultats

Survie de *S. typhimurium* en eau de mer

i - Numérations par NPP : Les résultats dans le touril d'eau de mer et dans le bac de contamination ayant reçu les moules sont représentés par la figure 3. Dans les conditions de l'expérience, la décroissance du nombre de salmonelles cultivables est lente (réduite d'un facteur 100 après 2 semaines).

ii - DVC (figure 4) : Les résultats confirment la survie de salmonelles viables dans l'eau de mer (après 10 jours de contact).

Survie de *C. jejuni* 86233

i - Appréciée par culture (figure 5) : Dans le touril, la disparition des *Campylobacter* cultivables est déjà importante en 48 heures (diminuée de 100 fois) et totale avant une semaine. La survie dans le bac de contamination est améliorée par rapport au touril.

ii - DVC (figure 6) : Confirme la disparition rapide de *C. jejuni* 86233. Des formes viables qui n'avaient pas été retrouvées en culture persistent cependant après 10 jours, à une concentration 10 000 fois plus faibles qu'initialement.

Accumulation des micro-organismes par les moules : L'accumulation des deux souches bactériennes par les moules se traduit par une forte concentration digestive, comparativement aux autres compartiments (figures 7 et 8). Les facteurs de concentration dans l'intestin postérieur, par rapport à l'eau de mer, dans deux expériences, sont de 282 et 206 pour *S. typhimurium* LEL et 100 et 140 pour *C. jejuni* 86233. A titre indicatif, il atteint 536 pour *T. suecica*.

Survie de *S. typhimurium* LEL dans les moules exondées

i - Dénombrements par culture (figure 7) : S'il n'existe aucune prolifération de cet inoculum déjà lourd au cours de la conservation, on ne constate pas non plus de diminution marquée au niveau intestinal. Dans les branchies et l'eau intervalvaire, au contraire, les salmonelles, présentes à une concentration égale ou supérieure à celle de l'eau du bac de contamination au sortir de ce dernier, se stabilisent dès la seconde analyse (48 h) à un taux environ 100 fois inférieur. Au total, pendant la semaine de conservation, la concentration en salmonelles cultivables a varié d'un facteur de 0,25 dans l'intestin, 0,0017 dans l'eau intervalvaire, 0,16 dans les branchies, 1,8 dans le manteau.

ii - DVC (figure 8) : Les résultats montrent que la majorité des salmonelles présentes dans les moules au cours de la conservation sont viables. Pendant la semaine de conservation, les concentrations varient d'un facteur de 0,057 dans l'intestin, 0,055 dans la glande digestive, 0,0025 dans l'eau intervalvaire.

Survie de *C. jejuni* 86233 dans les moules exondées

i - Dénombrements par culture (figure 9) : L'accumulation et la survie de *C. jejuni* 86233 sont médiocres dans le manteau, les branchies et même l'eau intervalvaire. Dans l'intestin cependant, *C. jejuni* est conservé pendant au moins quatre jours. Au 6^e jour, les concentrations retrouvées par culture ne sont plus, au mieux, que 1/10 000 de la concentration initiale.

ii - DVC (figure 10) : Dans l'intestin postérieur, on retrouve encore des *Campylobacter* viables le 7^e jour à une concentration qui n'est que 100 fois inférieure à celle du premier jour. La souche de *Campylobacter* n'est par contre retrouvée dans la glande digestive que lors des analyses effectuées dans les 48 premières heures (sensibilité de la technique : $7,5 \cdot 10^4$ bactéries . g⁻¹).

Contamination de l'eau de mer et de moules par *C. coli* 93 : Les résultats des dénombrements par culture figurent au tableau I.

Mobilité des isolats de *C. jejuni* 86233 et *C. coli* 93 : Après passage en eau de mer et dans les moules, les isolats recueillis aux 6^e et 7^e jours dans l'eau du

bac de contamination et les intestins de moules ont conservé leur morphologie et leur mobilité caractéristiques.

Indices d'association aux cellules HeLa en cultures : Avant expérience, les indices d'association sont de 1,5 pour *C. jejuni* 86233 et 5,7 pour *C. coli* 93. Cette dernière souche conserve ses capacités d'association après 6 jours dans le bac de contamination (IA = 4,3) et dans l'intestin postérieur des moules exon-dées (IA = 6,8).

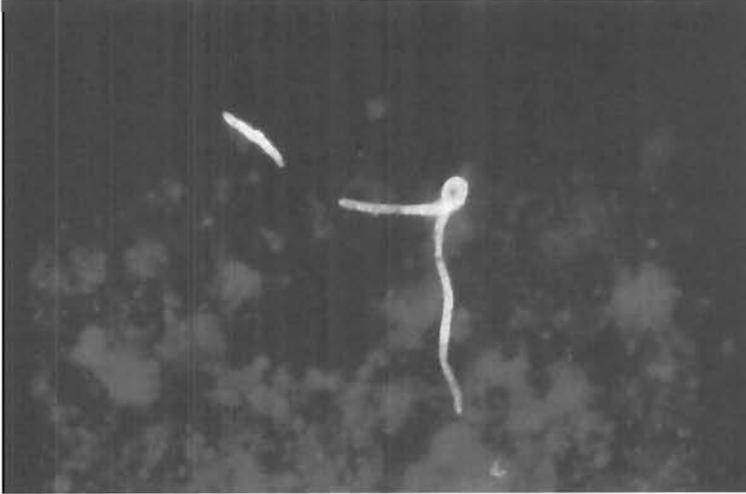


Figure 1 : DVC – Résultat pour *S. typhimurium* LEL (broyat de glande digestive de *M. edulis* contaminée au laboratoire)

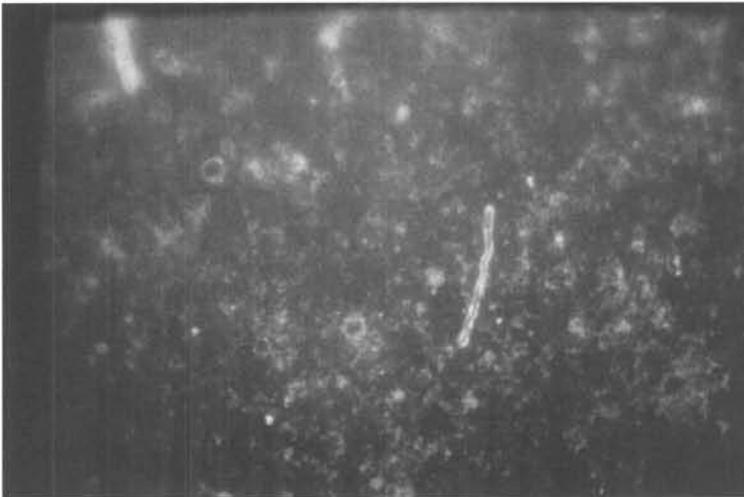


Figure 2 : DVC – Résultat pour *C. jejuni* 86233 (broyat d'intestin postérieur de *M. edulis* contaminée au laboratoire)

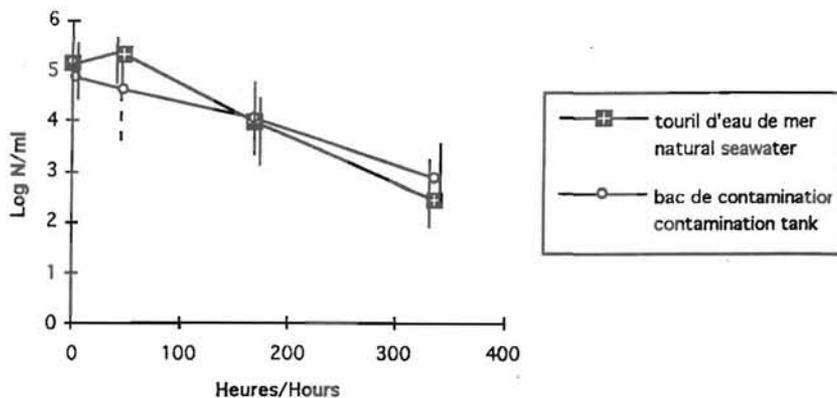


Figure 3 : Évolution de *S. typhimurium* NPP.ml⁻¹
Barres d'erreur : limites des valeurs, avec 5 % de risque d'erreur

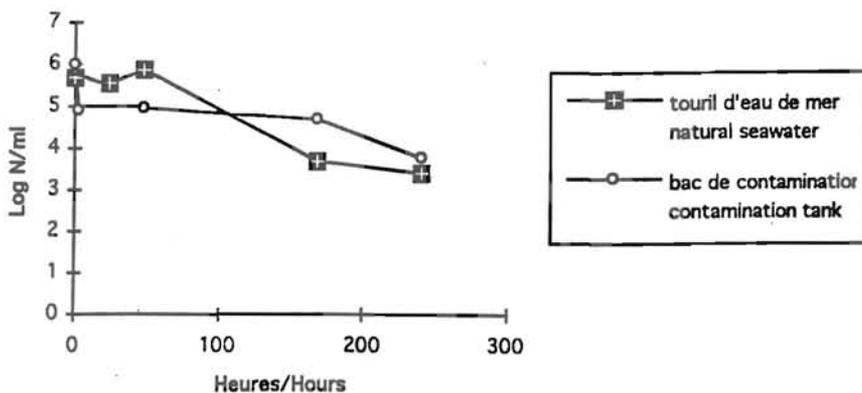


Figure 4 : Évolution de *S. typhimurium* DVC.ml⁻¹

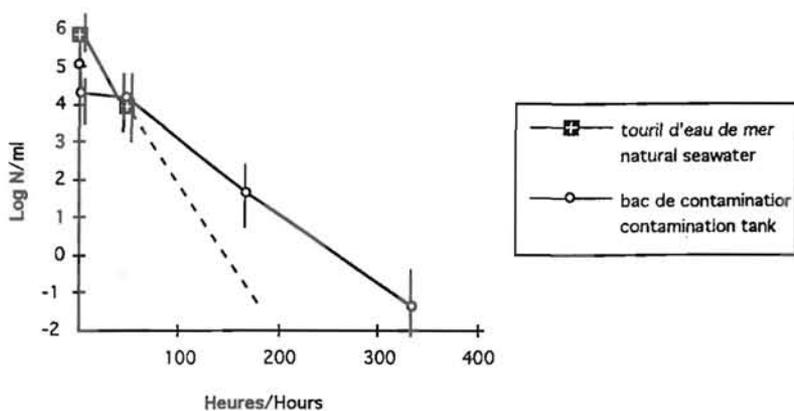


Figure 5 : Évolution de *C. jejuni* 86233 NPP.ml⁻¹
Barres d'erreur : limites des valeurs, avec 5 % de risque d'erreur

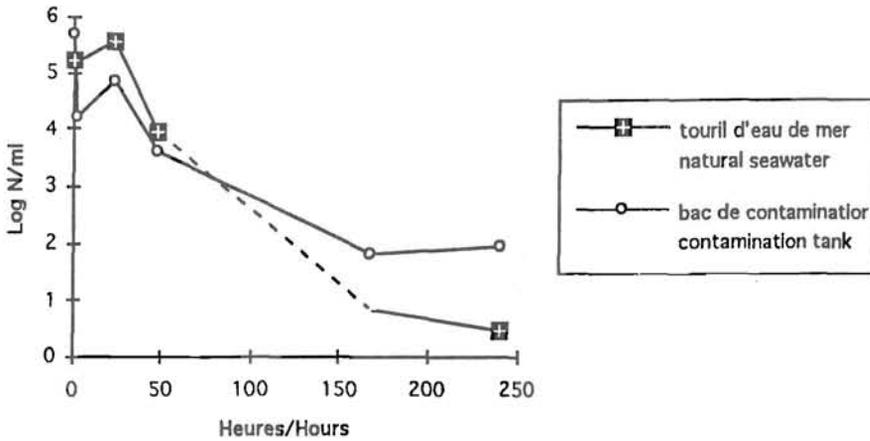


Figure 6 : Évolution de *C. jejuni* 86233 DVC.ml⁻¹

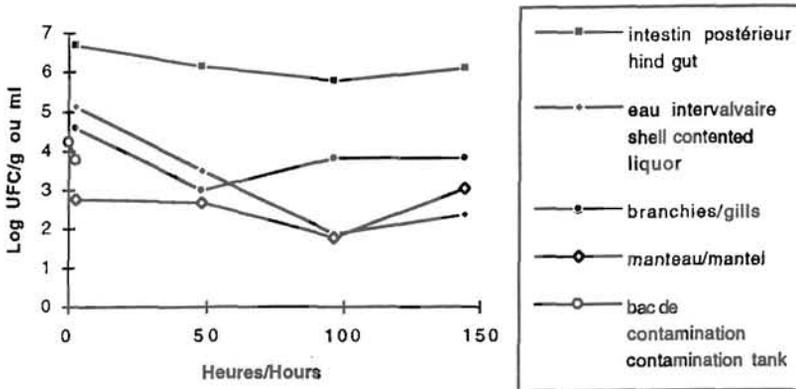


Figure 7 : Moules conservées au sec à 16 °C *S. typhimurium* LEL : dénombrements par étalement direct. UFC.g⁻¹ ou ml⁻¹

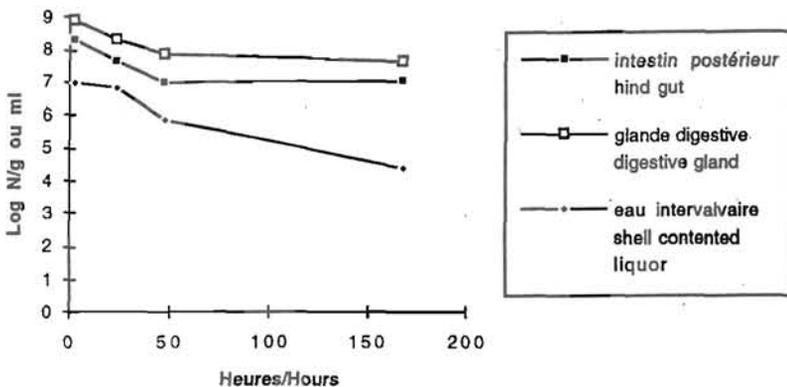


Figure 8 : Moules conservées au sec à 16 °C *S. typhimurium*, DVC.g⁻¹ ou ml⁻¹

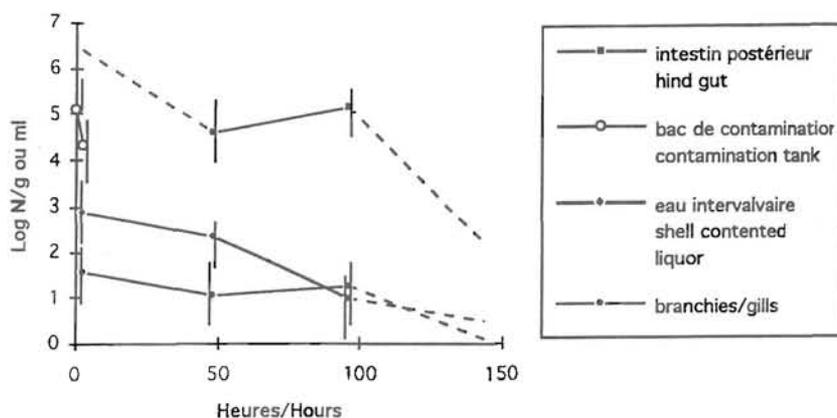


Figure 9 : Moules conservées au sec à 16 °C *C. jejuni* 86233, NPP.g⁻¹ ou ml⁻¹
Barres d'erreur : limites des valeurs avec 5 % de risque d'erreur

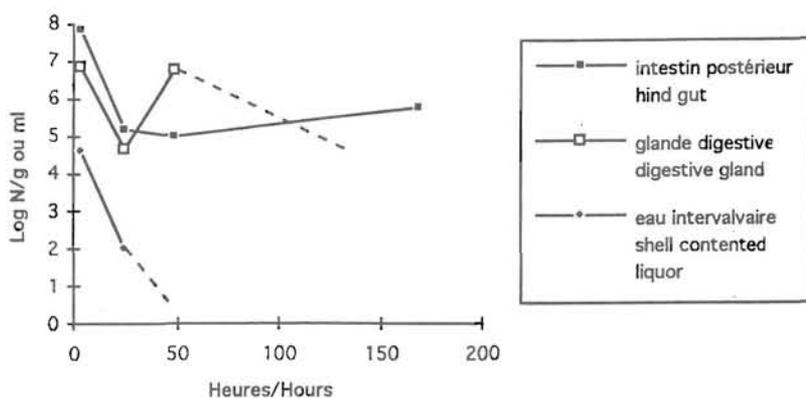


Figure 10 : Moules conservées au sec à 16 °C *C. jejuni* 86233, DVC.g⁻¹ ou ml⁻¹

Tableau 1 : *C. coli* 93 : numérations par étalement direct (UFC.ml⁻¹ ou g⁻¹)

Délai à partir du début de la contamination (heures)	0	48	96	144
Eau du bac de contamination	8.10 ⁶	1,2.10 ⁴	4,6.10 ²	25*
Intestin postérieur des moules exondées	< 10	1,3.10 ⁵	3.10 ³	10 ³ *

* Souches conservées pour l'étude des capacités d'adhésion aux cellules HeLa.

Discussion

La survie des bactéries de contamination, potentiellement entéropathogènes pour nombre d'entre elles, se doit d'être exactement appréciée du fait de risques sanitaires liés tant aux activités de baignade qu'à la consommation de coquillages crus ou insuffisamment cuits (Poggi, 1991). En particulier, la présence de formes viables non cultivables des pathogènes se doit d'être mieux appréciées (Xu *et al.*, 1982 ; Roszak *et al.*, 1984 ; Rollins et Colwell, 1986 ; Desmots *et al.*, 1990) afin d'en mieux préciser l'impact sanitaire réel. Leur mise en évidence passe encore par des techniques utilisant la microscopie (Roszak et Colwell, 1987) dont la faible sensibilité constitue une limite certaine (7.10^4 bactéries.g⁻¹ pour les broyats de tractus digestif de moules) réduisant leurs applications à des produits aisément filtrables en grands volumes, tel l'eau potable (Vesey *et al.*, 1990) ou à des milieux fortement contaminés. La réalisation du DVC nécessite une standardisation préalable. La technique sur filtre (Desmots *et al.*, 1992) permet en particulier de s'affranchir de facteurs présents dans le milieu étudié (telle la salinité) influençant l'activité de l'acide nalidixique. Nos résultats ont été obtenus à l'aide de contaminations simultanées par *Salmonella* et *Campylobacter* : la situation des deux pathogènes peut alors être analysée de façon comparative. Ceci pourrait poser la question d'un éventuel retentissement d'une souche sur la survie de l'autre. Deux constatations peuvent être faites à ce propos : l'évolution des numérations par culture de *C. coli* 93 utilisé seul au cours de la dernière expérience s'accorde avec ce qui avait été mesuré pour *C. jejuni* 86233 ; par ailleurs, la présence de *C. jejuni coli* dans le milieu extérieur serait peu compatible avec l'absence d'entérobactérie (Bolton *et al.*, 1987 ; Martikainen *et al.*, 1990). Dans l'eau de mer naturelle non vieillie et non stérilisée, utilisée à 16 °C, la survie de *S. typhimurium* LEL sous forme cultivable est réelle après 2 semaines. Ces résultats contrastent avec ceux d'autres études utilisant de l'eau vieillie et stérilisée par filtration (Xu *et al.*, 1982 ; Roszak *et al.*, 1984) à 25 °C qui montrent un passage très rapide des entérobactéries sous forme viable non cultivable. Le caractère plus ou moins oligotrophe du milieu pourrait expliquer ces différences. Ainsi, pour *S. typhimurium* LEL mais également *C. jejuni* 86233, une certaine protection semble être apportée dans le bac de contamination (présence de fèces de moules, d'algues unicellulaires...) par rapport à la survie mesurée dans le touril d'eau de mer pure étudié en parallèle. En tout état de cause, la survie en eau de mer de la souche de *Campylobacter* est très inférieure à celle de *Salmonella*, aussi bien lorsqu'elle est appréciée par culture que par dénombrement direct des cellules viables. La concentration de *Campylobacter* et de *Salmonella* s'est effectuée de façon efficace dans notre système, en présence de cellules de *T. suecica* (auxquelles les souches bactériennes étudiées ne sont jamais apparues liées lors des observations microscopiques) : l'intérêt des algues unicellulaires pour stimuler l'activité filtrante des mollusques a déjà été signalée (Timoney et Abston, 1984). Les bactéries accumulées sont majoritairement concentrées au niveau de l'intestin des moules ; ainsi, l'étude particulière de *S. typhimurium* et *C. jejuni* confirme des résultats précédents (Prieur, 1982 ; Kueh et Chang, 1985 ; Minet *et al.*, 1988) : l'analyse de la chair des mollusques n'est qu'un moyen de retrouver la flore digestive diluée par la masse de tissus qui ne comporte qu'une

faible contamination de surface (Power et Collins, 1990). Au cours de la conservation à 16 °C, des moules contaminées et exondées, on remarque la stabilité des numérations de *Salmonella* dans l'intestin postérieur alors que leur disparition de l'eau intervalvaire est manifeste. L'absence de prolifération des entérobactéries, contrastant avec l'augmentation significative de la flore mésophile totale, chez les moules exondées, apparaît de façon constante dans la littérature (Boury et Borde, 1965 ; Creamer, Fide Slabyj, 1980 ; Son et Fleet, 1980). Les cultures ne retrouvent pas de *Campylobacter* dans les moules après le 6^e jour de conservation. Le DVC permet d'observer, au 7^e jour, la persistance de formes viables de *Campylobacter* dans l'intestin des moules à une concentration comparable à celle obtenue à la 24^e heure. Dans ce biotope particulier, *C. jejuni* peut donc survivre, probablement sous la forme viable non cultivable décrite dans des systèmes très différents par Rollins et Colwell (1986). Nous avons vérifié qu'une souche de *C. coli* a conservé, après 6 jours en eau de mer ou dans des moules conservées au sec sa mobilité et ses capacités d'association aux cellules en culture, soit les facteurs conditionnant de façon fondamentale sa pathogénicité (Walker *et al.*, 1986).

Nous concluons de cette étude que la survie de *C. jejuni/coli* dans les mollusques bivalves, déjà signalée par Arumugawamy *et al.* (1988) chez des huîtres, est réelle. La persistance des formes infectieuses est compatible avec la survenue de maladie (Griffin *et al.*, 1983). Toutefois, la durée de vie extrêmement courte des *Campylobacter* en milieu marin, comparativement à celle des salmonelles, explique le caractère exceptionnel de la contamination des fruits de mer par les premiers comparativement aux problèmes que posent encore les secondes.

RÉFÉRENCES

- Anonyme, 1989. Maladie due à des mollusques testacés. Surveillance en Angleterre et au Pays de Galles, 1941-1987. *Bull. Epidemiol. Hebdom.* Paris, 7, 27.
- Arumugaswamy R.K., R.W. Proudford, M.J. Eyles, 1988. The response of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in the Sydney rock oyster (*Crassostrea commercialis*), during depuration and storage. *Intern. J. Food Microbiol.*, 7, 173-183.
- Arumugaswamy R.K., R.W. Proudford, 1987. The occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Sydney rock oyster (*Crassostrea commercialis*). *Intern. J. Food Microbiol.*, 4, 101-104.
- Blaser M.J., D.N. Taylor, R.A. Feldman, 1984. Epidemiology of *Campylobacter* infections. In : *Campylobacter* infection in man and animals, Butzler J.P. (e.d.), CRC Press, Boca Raton, 143-161.
- Bolton F.J., D. Coates, D.N. Hutchinson, A.F. Godfree, 1987. A study of thermophilic *Campylobacter* in a river system. *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 167-176.
- Boury M., J. Borde, 1965. L'évolution de la flore bactérienne dans les coquillages conservés hors de l'eau. In : Symposium : Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers, Monaco, Secrétariat général de la Commission internationale pour l'exploitation scientifique de la mer Méditerranée, Paris, 285-292.
- Desmots C., J. Minet, R.R. Colwell, M. Cormier, 1990. Florescent-antibody methode useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella sp.* in chlorinated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1448-1452.

- Desmonts C., J. Minet, R.R. Colwell, M. Cormier, 1992. An improved filter method for direct viable count of *Salmonella* in seawater. *J. Microbiol. Methods*, **16**, 195-201.
- Fauchere J.L., A. Rosenau, M. Veron, E.N. Moyen, S. Richard, A. Pfister, 1986. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infect. Immun.*, **54**, 283-287.
- Food and Drug Administration, 1978. Bacteriological Analytical Manual, Appendix D. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, D1-D20.
- Griffin M.R., E. Dalley, M. Fitzpatrick, S.H. Austin, 1983. *Campylobacter* gastroenteritis associated with raw clams. *J. Med. Soc. New Jersey*, **80**, 607-609.
- Knill M., W.G. Suckling, A.D. Pearson, 1978. Environmental isolation of heat-tolerant *Campylobacter* in the Southampton area. *The Lancet*, 4 novembre, **2**, 1002-1003.
- Kogure K., U. Simidu, N. Taga, 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420.
- Kueh C.S.W., K.Y. Chan, 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 41-47.
- Martikainen P.J., L.K. Korhonen, T.U. Kosunen, 1990. Occurrence of thermophilic *Campylobacter* in rural and urban surface waters in central Finland. *Wat. Res.*, **24**, 91-96.
- Megraud F., 1987. Réseau de surveillance nationale des infections à *Campylobacter*, bilan de l'année 1986. *Bull. Epidemiol. Hebdom. Paris*, **37**, 145-147.
- Megraud F., J. Latriille, 1981a. *Campylobacter jejuni* en pathologie humaine. I. Aspects cliniques et thérapeutiques. *Path. Biol.*, **29**, 245-253.
- Megraud F., J. Latriille, 1981b. *Campylobacter jejuni* en pathologie humaine. II. Diagnostic biologique et épidémiologie. *Path. Biol.*, **29**, 305-314.
- Minet J., 1991. Colonisation bactérienne de *Mytilus edulis* (L.) : la situation de *Campylobacter jejuni*. Thèse Doctorat ès Sciences pharmaceutiques, Rennes, 120 p.
- Minet J., T. Barbosa, D. Prieur, M. Cormier, 1987. Mise en évidence du processus de concentration des bactéries par la moule *Mytilus edulis* (L.). *C.R. Acad. Sci.*, **305(3)**, 351-354.
- Oblinger J.L., J.A. Koburger, 1975. Understanding and teaching the most probable number technique. *J. Milk Food Technol.*, **38**, 540-545.
- Pignault A., S. Cluzan, P. Dehaumont, B. Hubert, 1991. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1990. *Bull. Epidemiol. Hebdom.*, Paris, 99-101.
- Poggi R., 1991. Impacts sanitaires des contaminations microbiologiques. In : La mer et les rejets urbains, Bendor 13-15 juin 1990, Guillaud J.F. et Romana L.A. (eds.), IFREMER, Actes de colloques, **11**, 115-132.
- Poggi R., J.P. Berthomé, 1987. Intoxications dues aux dinoflagellés. *Bull. Epidemiol. Hebdom.*, Paris, **9**, 33-34.
- Power U.F., J.K. Collins, 1990. Tissues distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 803-807.
- Prieur D., 1982. Étude expérimentale de l'installation d'une microflore associée au tractus digestif de la moule *Mytilus edulis* (L.). In : Deuxième colloque de microbiologie marine, Marseille 24-25 juin 1981. CNEXO. Actes de colloques, **13**, 97-104.
- Rollins D.M., R.R. Colwell, 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 531-538.
- Roszak D.B., D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 334-338.
- Roszak D.B., Cowell R.R., 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51**, 365-379.
- Schwartzbrod L., C. Jehl-Petri, S. Boher, B. Hugues, M. Albert, C. Beril, 1991. Les contaminations par les virus. In : La mer et les rejets urbains, Bendor, 13-15 juin 1990, Guillaud J.F. et Romana L.A. (eds.), IFREMER, Actes de colloques, **11**, 101-104.

- Singh A., B.H. Pyle, G.A. McFeters, 1989. Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. *J. Microbiol. Meth.*, **10**, 91-101.
- Singh A., F.P. Yu, G.A. McFeters, 1990. Rapid detection of chlorine-induced bacterial injury by the direct viable count method using image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 389-394.
- Slabyj B.M., 1980. Storage and processing of mussels. In: Mussel culture and harvest: a north american perspective, Lutz R.A. (ed.). Elsevier, New York. Developments in aquaculture and fisheries sciences, **7**, 247-265.
- Son N.T., G.H. Fleet, 1980. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, relaying, and storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 994-1002.
- Timoney J.F., A. Abston, 1984. Accumulation and elimination of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by hard clams in an in vitro system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 986-988.
- Trollope D.R., 1984. Use of molluscs to monitor bacteria in water. In: Microbiological Methods for Environmental Biotechnology, *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser.*, **19**, 393-408.
- Vesey G., A. Nightingale, D. James, D.L. Hawthorne, J.S. Colbourne, 1990. Rapid enumeration of viable *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10**, 113-116.
- Walker R.I., M.B. Caldwell, C.E. Lee, P. Guerry, T.J. Trust, G.M. Ruiz-Palacios, 1986. Pathophysiology of *Campylobacter enteritis*. *Microbiol. Rev.*, **50**, 81-94.
- Xu H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, **8**, 313-323.