

Ecole Nationale Vétérinaire d'El Harrach

# Evaluation de la contamination des produits de la mer par les *Vibrio* et autres bactéries dans les côtes Est Algérienne



**Mémoire de magistère**

**Option : Hygiène et Sécurité des Aliments**

**Présenté par :  
DIB AMIRA LEILA**

**Devant le Jury composé de :**

**Président : B. BENDEDDOUCHE**  
**Promoteur : A. BENOUADEH**  
**Co-Promoteur : A. CHAHED**

Maître de conférences  
Maître de conférences  
Chargé de cours

ENV. Alger  
ENV. Alger  
ENV. Alger

**Examineur : T. M. HAMDI**  
**Examineur : K. HARHOURA**  
**Examineur : K. T. BOUKHORS**

Maître de conférences  
Chargé de cours  
Maître de conférences

ENV. Alger  
ENV. Alger  
ENV. Alger

**Année Universitaire 2007/2008**

# SOMMAIRE

**Remerciements**

**Dédicaces**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures et des photos**

**Partie Bibliographique**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Historique.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Classification.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Caractères bactériologiques.....</b>	<b>6</b>
<b>5. Caractères cultureux.....</b>	<b>7</b>
<b>6. Importance des différentes espèces de <i>Vibrio</i>.....</b>	<b>7</b>
6.1. <i>Vibrio cholera</i> .....	7
6.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	9
6.3. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	9
<b>7. Facteurs de virulence et d'adhésion.....</b>	<b>10</b>
7.1. <i>Vibrio cholera</i> .....	10
7.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	12
7.3. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	13
7.4. Autres espèces de <i>Vibrio</i> .....	14
<b>8. Pathogénie.....</b>	<b>16</b>
8.1. <i>Vibrio cholera</i> .....	16
8.2. <i>Vibrio parahemolyticus</i> .....	16
<b>9. Symptomatologie des infections à <i>Vibrio</i>.....</b>	<b>17</b>
9.1. <i>Vibrio cholera</i> .....	17

9.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	19
9.3. Autres <i>Vibrio</i> .....	20
<b>10. Traitement</b> .....	<b>22</b>
<b>11. Facteurs de développement</b> .....	<b>23</b>
11.1. Température.....	24
11.1.1. <i>Vibrio cholera</i> .....	24
11.1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	24
11.1.3. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	25
11.2. ph.....	25
11.3. L'activité de l'eau ( $a_w$ ).....	25
11.3.1. <i>Vibrio cholerae et Vibrio mimicus</i> .....	25
11.3.2. <i>Vibrio. Parahaemolyticus</i> .....	25
11.3.3. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	25
<b>12. Prévention et maîtrise du risque à <i>Vibrio</i></b> .....	<b>27</b>
12.1. Le vaccin.....	27
12.2. Procédés de maîtrise.....	29
12.2.1. La chaleur.....	29
12.2.2. Le froid.....	30
12.2.3. Purification.....	31
12.2.4. Irradiation.....	32
12.2.5. Conditionnement sous vide.....	33
11.2.6. Les désinfectants.....	33
<b>13. Epidémiologie</b> .....	<b>34</b>
13.1. Réservoirs.....	34
13.1.1. L'homme.....	34
13.1.2. Les animaux.....	37
13.2. Prévalence dans les aliments.....	37

13.3. Fréquence des infections et intoxications à <i>Vibrio</i> dans le monde.....	42
13.3.1. <i>Vibrio cholerae</i> O1 et O139.....	42
13.3.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	44
13.3.3. <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 et non-O139 .....	47
<b>14. Méthodes de détection de <i>vibrio</i> spp.....</b>	<b>49</b>
14.1. Méthodes microbiologique pour la détection des <i>Vibrio</i> .....	52
14.2. Méthodes génétiques pour la détection des <i>Vibrio</i> .....	52
14.2.1. La PCR (Polymerase Chain Reaction).....	52
14.2.2. Principe de la PCR en temps réel.....	53
14.2.3. Séquences amplifiées.....	53
 <b>Partie expérimentale</b>	
<b>1. Objectifs de l'étude.....</b>	<b>54</b>
<b>2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>55</b>
2.1. Lieux et périodes de prélèvements.....	55
2.2. Matériel.....	55
2.3. Matrices analysées et nombre de prélèvements.....	55
2.3.1. Fruits de mer.....	55
2.3.2. Eau de mer.....	57
2.4. Technique d'échantillonnage.....	61
2.4.1. Collecte des échantillons et transport.....	61
2.5. Méthodologie de recherche.....	61
2.5.1. Réalisation de la prise d'essai.....	61
2.5.2. Protocole de recherche de <i>Vibrio</i> dans les fruits de mer.....	62
2.5.3. Protocole de recherche des <i>Vibrio</i> dans l'eau de mer.....	69
2.5.4. Etude statistique.....	69

## **Résultats**

<b>3. Résultats sur la recherche de <i>Vibrio spp.</i></b> .....	<b>71</b>
3.1. Prévalence de <i>Vibrio</i> .....	<b>71</b>
3.2. Caractérisation biochimique de la souche de <i>Vibrio</i> isolée.....	<b>74</b>
<b>4. Caractérisation biochimique des bactéries autres que <i>Vibrio</i> isolées sur TCBS</b> .....	<b>77</b>
4.1. Prévalence de la contamination bactérienne dans les échantillons de fruits de mer.....	<b>77</b>
4.2. Contamination bactérienne dans l'eau de mer.....	<b>80</b>
4.3. Caractérisation des espèces bactériennes isolées à partir des fruits de mer.....	<b>80</b>
4.4. Caractérisation des espèces bactériennes isolées dans l'eau de mer.....	<b>80</b>
4.5. Caractérisation bactériologique et biochimique des espèces bactériennes isolées sur TCBS.....	<b>81</b>

## **Discussion**

<b>5. Intérêt de l'étude</b> .....	<b>84</b>
<b>6. Méthodologie d'échantillonnage</b> .....	<b>85</b>
<b>7. Méthodologies de recherché</b> .....	<b>86</b>
<b>8. Prévalence et contamination par <i>Vibrio spp.</i></b> .....	<b>90</b>
<b>9. Prévalence et identification des autres bactéries isolées</b> .....	<b>93</b>
<b>10. Etude statistique</b> .....	<b>96</b>
<b>11. Conclusion</b> .....	<b>97</b>
<b>Recommandations</b> .....	<b>98</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>100</b>

## **Annexes**

### **Résumé**

## Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur **BENDEDDOUCHE BADIS**, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse .Hommage respectueux.

Je remercie Monsieur **HAMDI TAHA MOSSADEK** ainsi que Monsieur **HARHOURA Khaled**, Mademoiselle **BOUKHORS KARIMA** qui ont accepté de faire partie mon jury de thèse et d'examiner mon travail.

Je Remercie mon promoteur ; Monsieur **BENOUADEH ALI**, d'avoir accepté d'être mon promoteur

Je tiens tout particulièrement à remercier ma co- Promotrice : Madame **CHAHED AMINA** qui m'a proposé ce sujet et m'a dirigé tout au long de mon travail, avec sérieux et abnégation. Merci pour votre confiance, vos encouragements et votre patience.

Qu'ils trouvent tous ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce modeste travail.

A Monsieur Mekkroud directeur de l'ISVK, qui m'a permis de réaliser ma partie pratique au sein de l'ISVK , ainsi que pour ses encouragements.

A Rabie, technicien du Laboratoire d'HIDAOA, ISVK , Constantine

Aux

Dr Kerrou Ilhemen, ingénieur du Laboratoire de microbiologie, ISVK, Constantine

Dr. Kebouya, Maître de conférences en microbiologie, ISVK, Constantine

Dr Guabli, Maître de conférences en microbiologie, ISVK, Constantine

Dr Lakhdara Nedjouda, Chargé de cour en Alimentation et zootechnie, ISVK, Constantine

Dr Kouadria Souha, Chef de Laboratoire d'histologie, ISVK, Constantine

A Melle Zenia, Maître assistante en Statistique

Pour leur aide, soutien et encouragements.

Au Dr Zaoui Kossay chercheur en oncologie pour son aide

A tout mes collègues et anciens enseignants de l'ISVK, Constantine

A tout mes enseignants de la poste graduation de l'Ecole Vétérinaire d'Alger, El Harrach

A tout les membres du corps administratif de l'ISVK de Constantine et de l'Ecole Vétérinaire d'Alger El Harach,

## Dédicaces

J'offre ce mémoire qui est le fruit de mes études et de mes efforts à ma chère mère Hakima pour celle qui, mille mémoires ne feront pas le poids de ses sacrifices.

Maman pendant toutes ses années, tu as été à la fois ma mère, mon père, mon frère, ma sœur, mon amie, ma confidente, mon ange gardien, et c'est grâce à tout ce que tu m'as inculqué, à ta gentillesse, ta patience, ta bonté, ta générosité, ton éducation et tes encouragements que j'ai pris le bon chemin et que je suis arrivée là.

J'espère qu'aujourd'hui tu es fière de moi et satisfaite de mon parcours qui est plus le tien que le mien.

Merci maman je te dois tout et je prie dieu de te garder longtemps près de moi.

Je t'aime.

## ***Dédicaces***

A **Kossay** avec tout mon amour, pour sa patience, sa compréhension, son aide et ses encouragements

**A mes oncles maternels:**

Merci d'être toujours présents à mes côtés.

Merci pour votre aide, soutien et compréhension.

A **mon père** Nadjib pour son soutien et ses encouragements

A **tata Amina** ma deuxième maman, merci pour ton accueil, tes encouragements et pour tout ce que tu as fait pour moi.

A **Nazim** mon petit frère (bibouche), pour ses encouragements son aide et son soutien, merci d'avoir supporté mes caprices

A **La Aziza** pour sa gentillesse et ses encouragements

A **Khalti Bariza** pour ses encouragements

A **tata Fatiha** son époux et ses enfants

**A mes grands parents maternels:**

Pépé et mémé: Ces surnoms me font rappeler des personnes très chères, bonnes et généreuses. Je leur présente toute ma gratitude de m'avoir élevé, veillé sur moi et encouragé dans mes études.

Je suis sûre que si vous étiez encore en vie vous seriez très fiers de moi.

Merci pour tout ce que vous m'avez appris, reposez en paix.

**A mes grands parents paternels** qu'ils reposent en paix

**A mes tantes paternelles:**

**Tata Anissa** et son époux tonton mokded pour leur accueil, attention et gentillesse

A leurs filles (Isma, Hanene, Samar et Sahar)

**Tata Abla**

**A Soraya et Tarik**

**A mes cousines** (Nedjoua, Ibtissem, Maria, Feriel, Mayou)

**A mes amies** Aziza, Asma, Yasmine, Ines, Souha

**A mes camarades** de la promotion «Hygiène et Sécurité des Aliments»

(Faïçal, Asma, Sabrine, Wahiba, Leila, Linda, Faiza, Lyla)

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ARN**: Acide

Ribonucléotide

**API**: Analytic Prophylactic Index

**AP W**: Water Peptone Alkaline

**a<sub>w</sub>**: activité de l'eau

**BAM**: Bacteriological Analytical Manual

**C°**: Degré Celsius

**CC agar**: gélose au Cellobiose Colistin

**CDC**: Center for Disease Control and prevention (USA)

**Cf** : Conféré

**CMB**: Center for Molecular Biotechnology

**CNRVC**: Centre National de recherché de *Vibrio* Cholera

**CNRS**: Centre National de la Recherche Scientifique

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**CP**: Croissing pont

**CT**: enterotoxine (toxine cholérique)

**CT**: Threshold Cycle

**EPA**: Eau Peptonée Alcaline

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**FDA**: Food Drug Administration

**FMV**: Faculté de Médecine Vétérinaire

**g** : gramme

**GNS**: Gélose Nutritive Alcaline

**H<sub>2</sub>O**: Sulfate d'hydrogene

**ICMSF**: International Commission on Microbiological Specifications for Foods

**I.N.S.P**: Institut National de se Santé Publique

**ISO**: International for Standardisation Organisation

**K<sup>+</sup>** : Kanagawa positive

**k<sup>-</sup>** : Kanagwa négative

**KIA**: Kligler Iron Agar

**kGy** :kilograys

**Log<sub>10</sub>**: Logarithme decimal

**LPS**: Lypopolysaccharide

**mCPC agar** : Gélose Cellobiose - Polymyxine B - Colistine Modifiée

**MFLP**: Procédure de Laboratoire, Microbiologie des Aliments

**ml** : millilitre

**MNP**: Most Probable Number

**NaCl** : Chlore sodium

**NAG** : Non agglutinating

**nd** :non detecté

**NSSP**: United States National Shellfish Sanitation program

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PFGE**: Pulsed Field Gel Electrophoresis

**PH** : Potentiel Hydrogène

**PPM**: Partie Par Million

**PSB**: Phosphate Buffer Solution

**SCF**: Scientific Committee on Food

**SPP**: Plusieurs espèces

**SRO** : Sel de réhydratation orale

**ST**: entérotoxine Thermostable

**TCBS**: Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose

**TDH** :Hémolysine Thermostable Direct

**TRH** : Hémolysine Thermolabile indirect

**UFC**: Unité formant colonie

**USA**: United States of America

*V* : *Vibrio*

**VP**: Voges Proskauer

**WHO**: World Health Organisation

**µm** : micromètre

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification des <i>Vibrio</i> .....	<b>4</b>
<b>Tableau 2:</b> Différenciation des quatre genres formant la famille des Vibrionaceae.....	<b>5</b>
<b>Tableau 3:</b> Les 51 espèces du genre <i>Vibrio</i> .....	<b>6</b>
<b>Tableau 4:</b> Position du vibrion cholérique ( <i>Vibrio cholerae</i> O1 et O139) au sein de l'espèce <i>Vibrio cholerae</i> .....	<b>8</b>
<b>Tableau 5:</b> Distribution en pourcentages des activités enzymatiques et biologiques de 52 souches de <i>Vibrio</i> halophiles issues de l'eau de mer.....	<b>15</b>
<b>Tableau 6:</b> Formes cliniques, facteurs de transmission et facteurs de risque des infections à <i>Vibrio</i> non cholériques.....	<b>21</b>
<b>Tableau 7:</b> Facteurs de développement de <i>Vibrio cholerae</i>	
<b>Tableau 8:</b> Facteurs de développement de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	<b>26</b>
<b>Tableau 9:</b> Facteurs de développement de <i>Vibrio vulnificus</i> .....	<b>26</b>
<b>Tableau 10:</b> Prévalence de plusieurs espèces de <i>Vibrio</i> dans différents prélèvements durant une étude sur des élevages de crevettes en Inde.....	<b>37</b>
<b>Tableau 11:</b> Incidence de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> dans les aliments importés à Taïwan...	<b>40</b>
<b>Tableau 12:</b> Nombre et prévalence de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> dans les huîtres, les sédiments et l'eau.....	<b>41</b>
<b>Tableau 13:</b> Toxi-infections alimentaires associées à <i>Vibrio parahaemolyticus</i> aux Etats-Unis .....	<b>42</b>
<b>Tableau 14:</b> Incidence des infections humaines à <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en Europe.....	<b>46</b>
<b>Tableau 15:</b> Cas d'infections à vibrions non cholériques identifiés entre 1995 et 2000 par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra.....	<b>46</b>
<b>Tableau 16:</b> Distribution des espèces de vibrions en fonction des syndromes en France en 1999- 2001.....	<b>48</b>
<b>Tableau 17:</b> Matrices analysées et nombre de prélèvements .....	<b>48</b>

<b>Tableau 18:</b> Caractérisation biochimique des <i>Vibrio</i> .....	<b>51</b>
<b>Tableau 19:</b> Matrices analysées et nombre de prélèvements.....	<b>56</b>
<b>Tableau 20:</b> Répartition et nombre des échantillons de fruits de mer prélevés par période et par mois.....	<b>57</b>
<b>Tableau 21:</b> Nombre de prélèvements d'eau de mer.....	<b>58</b>
<b>Tableau 22:</b> Matrices analysés et nombre de prélèvements par région et par mois.....	<b>59</b>
<b>Tableau 23:</b> Répartition du cas positif dans les échantillons.....	<b>71</b>
<b>Tableau 24:</b> Répartition du cas positif isolé dans les fruits de mer, dans les 5 régions.....	<b>72</b>
<b>Tableau 25 :</b> Répartition du cas positif selon les mois.....	<b>73</b>
<b>Tableau 26 :</b> Identification biochimique de la souche <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	<b>74</b>
<b>Tableau 27:</b> Caractères biochimiques de <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	<b>75</b>
<b>Tableau 28:</b> Répartition des échantillons positifs isolés dans les fruits de mer.....	<b>77</b>
<b>Tableau 29:</b> Répartition des échantillons de fruits de mer contaminés par région.....	<b>78</b>
<b>Tableau 30 :</b> Répartition des échantillons de fruits de mer positifs pendant les mois de prélèvements.....	<b>79</b>
<b>Tableau 31 :</b> Récapitulatif des échantillons présentant une contamination pendant chaque mois et dans chaque région.....	<b>79</b>
<b>Tableau 32:</b> Prévalences des espèces bactériennes dans les produits de la mer et l'eau de mer.....	<b>81</b>
<b>Tableau 33:</b> Caractères bactériologiques et identification biochimique des espèces bactériennes isolées sur TCBS.....	<b>82</b>
<b>Tableau 34:</b> Résultats sur KIA.....	<b>83</b>
<b>Tableau 35 :</b> Caractères biochimiques des espèces bactériennes isolées sur TCBS.....	<b>83</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Structure de la toxine.....	<b>11</b>
<b>Figure 2:</b> Schéma pathophysiologique du choléra.....	<b>34</b>
<b>Figure 3:</b> Incidence du cholera en Algérie.....	<b>44</b>
<b>Figure 4:</b> Répartition du nombre des échantillons.....	<b>56</b>
<b>Figure 5:</b> Diagramme des échantillons de fruits et d'eau de mer réalisés dans les 5 régions de l'est Algérien.....	<b>60</b>
<b>Figure 6:</b> Résultats de la galerie API20E reportés sur la fiche d'identification.....	<b>67</b>
<b>Figure 7:</b> Schéma pour l'isolement des <i>Vibrio</i> dans les aliments.....	<b>68</b>
<b>Figure 8:</b> Schéma d'isolement des <i>Vibrio</i> dans l'eau de mer.....	<b>70</b>
<b>Figure 9:</b> Fréquence du cas positif de <i>Vibrio</i> dans les échantillons.....	<b>72</b>
<b>Figure 10:</b> Répartition du cas positif isolé dans les fruits de mer dans les 5 régions.....	<b>73</b>
<b>Figure 11:</b> Répartition des échantillons positifs dans les fruits de mer .....	<b>78</b>

## Liste des photos

<b>Photo 1:</b> Infections causées par <i>vibrio vulnificus</i> .....	<b>21</b>
<b>Photo 2:</b> Manipulation d'un échantillon de crevettes.....	<b>61</b>
<b>Photo 3 :</b> Pesée de 25g de crevettes.....	<b>63</b>
<b>Photo 4:</b> Suspension mère à 1% de NaCl.....	<b>63</b>
<b>Photo 5:</b> Suspension mère à 5% de NaCl.....	<b>63</b>
<b>Photo 6:</b> Ensemencement en surface par stries sur gélose TCBS.....	<b>64</b>
<b>Photos 7:</b> Ensemencement en profondeur sur gélose TCBS.....	<b>64</b>
<b>Photo 8:</b> Ensemencements des deux suspensions mères (1% et 5% de NaCl) incubés 6 à 8h, sur gélose TCBS et incubés à 37°C pendant 18-24h.....	<b>64</b>
<b>Photo 9:</b> Ensemencements des deux suspensions mères (1% et 5% de NaCl) incubés 18 à 24h, sur gélose TCBS et incubés à 37°C pendant 18-24h.....	<b>65</b>
<b>Photo 10:</b> Aspect de <i>Vibrio alginolyticus</i> sur gélose TCBS.....	<b>74</b>

**Photo 11:** Galerie biochimiques pour identification de *Vibrio alginolyticus*.....**76**

**Photo 12:** Résultat de la galerie reporté sur la fiche d'identification.....**76**

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Introduction

Les produits de la pêche entrent de manière significative dans la diète alimentaire et constituent, pour certains pays, la source majeure de protéines d'origine animale. Le secteur de la pêche est également une source d'emplois et d'échanges extérieurs. Malgré cette importance socio-économique, les produits de la pêche sont les vecteurs d'une multitude de maladies d'étiologie bactérienne, virale, parasitaire et toxique (AgroVet Magazine, 1997).

Au sein des produits de la pêche, les mollusques bivalves (moules, huîtres, palourdes, etc.) et les crustacés (crevettes, crabes), occupent une place particulière. Ce sont des filtreurs qui accumulent de manière biologique des micro-organismes pathogènes et des substances toxiques. Il en résulte de nombreuses toxi-infections alimentaires dues à l'ingestion de ce type d'aliments. Parmi les agents responsables de maladies et de toxi-infections alimentaires, les *Vibrio* constituent dans de nombreux pays un réel problème de santé publique en raison de la consommation accrue de produits de la mer (China. B et al., 2003).

La législation internationale plus précisément européenne (CE n° 2073/2005), préconise la mise au point de méthodes fiables pour l'évaluation des risques liés aux virus et aux *Vibrio* dans les produits de la mer (Robert-pillot. A, 2006).

Mis à part le choléra, maladie à déclaration obligatoire selon le Règlement sanitaire international de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), il n'existe pratiquement aucun système de surveillance pour les autres infections à vibrions non cholériques et beaucoup d'incertitudes demeurent quant au danger qu'elles représentent (Bonhomme. A, 2003).

Notre étude comporte deux parties distinctes:

Une partie bibliographique qui synthétise les données relatives aux espèces de *Vibrio* et une partie pratique qui a pour objectifs dans un premier temps de rechercher la présence des *Vibrio* dans les crustacés (crevettes, crabes), les mollusques (moules), et dans l'eau de mer de la région de Jijel, Colo, Skikda, Annaba et El Kala et d'identifier les souches isolées et de les caractériser et dans un deuxième temps d'identifier et de caractériser d'autres bactéries isolées sur gélose TCBS.

## 2. Historique

Pendant des siècles, la maladie du cholera était inconnue en Europe, se propageant surtout en Asie et en Afrique. La première mention de cette maladie en Europe date de 1503 et a été faite par un officier portugais appelé Vasco de Gama qui en revenant des Indes, avait décrit une épidémie de diarrhées cataclysmiques rapidement mortelles (en 8 heures), ayant entraînée le décès de 20000 personnes. Elle apparut par la suite en Europe et fut l'objet de grandes multitudes d'interprétations et de théories de la part des médecins (Anonyme2).

C'est lors de l'épidémie de 1854, à Londres, que la compréhension de la maladie connaît une avancée majeure. On se rendit compte qu'elle sévissait à proximité de certains puits, suggérant une contamination par l'eau. Mais cette hypothèse ne fut pas immédiatement admise à l'époque (Anonyme 3).

*Vibrio cholerae* a été pour la première fois identifiée comme agent responsable du choléra par l'anatomiste italien Filippo Pacini en 1854, mais sa découverte sera ignorée à cause de la prédominance de la théorie du miasme, imputant la responsabilité du choléra et d'autres maladies dont on ne connaissait pas l'origine, à une mauvaise qualité de l'air (Fournier et Quilici, 2002).

Trente ans plus tard, Robert Koch, qui n'était pas au courant des résultats de Pacini, publie le résultat de ses travaux et les moyens de prévenir *Vibrio cholerae* (Fournier et Quilici, 2002).

Au début des années 50 une nouvelle espèce de *Vibrio* pathogène pour l'homme est identifiée (Fujino *et al.*, 1953). Elle a été isolée des selles de patients victimes d'une intoxication alimentaire collective à Osaka au Japon, et due à la consommation d'une sardine partiellement séchée appelée « Shirasu ». Fujino *et al.*, 1953, isolèrent une bactérie mobile évoquant *Vibrio cholerae* à partir des anchois, cette bactérie n'agglutinait pas l'antisérum anti-*Vibrio cholerae*, et n'était pas incurvée et ne présentait pas une coloration bipolaire sur gélose de sang, le germe était hémolytique. Cette bactérie a été classée dans le genre *Pasteurella* avec l'appellation de "*Pasteurella parahaemolytica*", proche de *Pasteurella haemolytica* ou *Mannheimia haemolytica* (Euzéby, 2005).

En 1961, Miyamoto *et al.* Considérant que la fermentation du glucose est incompatible avec *Pseudomonas* spp, et transférèrent le germe dans le nouveau genre "*Oceanomonas*" ("*Oceanomonas parahaemolytica*") (Euzéby, 2005).

En 1963, Sakazaki *et al.* étudièrent 1072 souches de "*Oceanomonas parahaemolytica*" qui leur permirent de classer ce micro-organisme dans le genre *Vibrio*. Au sein de l'espèce *Vibrio parahaemolyticus*, ces auteurs individualisent deux biovars, le biovar 1 ou Parahaemolyticus (ne produisant pas d'acétoïne et incapable de cultiver en présence de 10% de NaCl) et le biovar 2 ou *alginolyticus* (produisant de l'acétoïne et cultivant en présence de 10% de NaCl) (Euzéby, 2005). En 1965, la bactérie est renommée en *Vibrio cholerae* en hommage à Filippo Pacini (*Pacini, 1854*).

L'espèce *Vibrio alginolyticus* très abondante dans le milieu marin mais rarement isolée chez l'homme a été décrite en 1968.

Au début des années 70, des cas d'infections extra-intestinales associant des nécroses et œdèmes tissulaires, des formes septicémiques d'infection avec parfois mortalité brutale sont apparues aux Etats-Unis (Bonhomme. A, 2003).

L'agent isolé pour la première fois a été confondu avec *Vibrio parahaemolyticus* et appelé vibriion non-cholérique, reconnu comme étant une nouvelle espèce par Reichelt *et al.*, (1976), ils ont proposé de classer cet organisme dans le Genre *Beneckeia* et de lui donner le nom d'espèce *vulnificus* qui signifie « blessure » en latin.

En 1971, Baumann *et al.* transfèrent *Vibrio parahaemolyticus*, ainsi que d'autres vibriions isolés de l'eau de mer, dans le genre *Beneckeia*.

En 1974, la huitième édition du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" décrit *Vibrio parahaemolyticus* et reconnaît l'existence des biovars Parahaemolyticus et Alginolyticus (Euzéby, 2005).

En 1975, le sous-comité de taxonomie des *Vibrio* recommande d'élever chacun des ces biovars au rang d'espèce et, ultérieurement, les résultats des hybridations ADN-ADN confirmeront l'individualisation des espèces *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio alginolyticus*.

Le 01 janvier 1980, Baumann *et al.* retiennent les nomenclatures de *Vibrio parahaemolyticus* et de *Beneckeia parahaemolytica*.

En 1981, Baumann *et al.* transfèrent toutes les espèces du genre *Beneckeia* dans le genre *Vibrio*. Cette proposition a été largement acceptée par les bactériologistes et les nomenclatures de *Beneckeia* et de *Beneckeia parahaemolytica* ne sont pratiquement plus utilisées (Euzéby, 2005).

Ces organismes ne possédant pas l'antigène O1 caractéristique de *V. cholerae* sont aujourd'hui identifiés comme *V. cholerae* non O1 ou NAG (Non Agglutinating Vibrio) ou encore NCV (Non *Cholera* Vibrio) (ICMSF, 1996).

En 1992, une nouvelle souche de choléra, n'agglutinant pas l'antisérum O1, mais produisant une toxine cholérique, a été découverte au Bangladesh et en Inde et reconnue comme étant l'agent causal d'un cas typique de choléra. Le sérotype a été décrit comme appartenant au nouveau séro groupe O139 en 1993 (Bonhomme. A, 2003).

### 3. Classification

Les bactéries du genre *Vibrio*, appartiennent à la famille des Vibrionaceae (Véron, 1965 ; Thompson *et al.*, 2004) (cf tableau 1).

**Tableau 1**  
Classification (**Anonyme 3**)

<b>Règne</b>	Bacteria
<b>Embranchement</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Gamma proteobacteria
<b>Ordre</b>	Vibrionales
<b>Famille</b>	Vibrionaceae
<b>Genre</b>	<i>Vibrio</i>

Cette famille se différencie de celle des Pseudomonaceae par le fait que ses membres peuvent pousser en milieu anaérobie, et de celle des enterobacteriaceae, car ses membres sont sensibles à l'agent vibriostatique O129 et sont positifs à l'oxydase (Madden et Mc Cardell, 1989).

La famille des vibrionaceae compte trois autres genres : *Photobacterium*, *Plesiomonas* et *Aeromonas*, ces deux derniers comptent des espèces connues pour être la cause de diarrhées et infections septicémiques chez l'homme (cf tableau 2).

**Tableau 2**

Différenciation des quatre genres formant la famille des vibrionaceae (Madden et Mc Cardell, 1989).

Propriétés	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Aeromonas</i>
<b>p.100 molaire Guanine + cytosine</b>	38-51	40-44	51	57-63
<b>Sensibilité à l'agent O129</b>	+	+	+	-
<b>Fermentation du D-mannitol</b>	+	-	-	+
<b>Nécessite l'ion Na+ pour la croissance ou stimuler la croissance</b>	+	+	-	-

Parmi les espèces décrites dans le genre *Vibrio*, on compte aujourd'hui 51 espèces (cf tableau3), certaines espèces ne sont pas pathogènes pour l'homme mais peuvent l'être pour les poissons (*V. anguillarum*) ou les crevettes (*V. penaeicida*).

**Tableau 3**Les 51 espèces du genre *Vibrio* (Fournier et Quilici, 2002)

Espèces considérées comme pathogènes pour l'Homme	Autres espèces	
<b>- Espèces fréquemment isolées</b>	<i>V. aerogenes</i>	<i>V. navarrensis</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. aestuarianus</i>	<i>V. nereis</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V. albensis</i>	<i>V. nigripulchritudo</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. ordalii</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. orientalis</i>
<b>- Espèces rarement isolées</b>	<i>V. costicola</i>	<i>V. pectenica</i>
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. pelagius</i>
<i>Vibrio hollisae</i>	<i>V. diabolicus</i>	<i>V. penaeicida</i>
<i>Vibrio mimicus</i>	<i>V. diazotrophicus</i>	<i>V. proteolyticus</i>
<b>- Espèces dont la pathogénicité est douteuse</b>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. rumoiensis</i>
<i>Vibrio carchariae</i>	<i>V. gazogenes</i>	<i>V. salmonicida</i>
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	<i>V. haliotocoli</i>	<i>V. scophthalmi</i>
<i>Vibrio damsela</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>V. ichthyoenteri</i>	<i>V. succinogenes</i>
<i>Vibrio metschnikovii</i>	<i>V. iliopiscarius</i>	<i>V. tapetis</i>
	<i>V. logei</i>	<i>V. trachuri</i>
	<i>V. marinus</i>	<i>V. tubiashii</i>
	<i>V. mediterranei</i>	<i>V. viscosus</i>
	<i>V. mytili</i>	<i>V. wodanis</i>
	<i>V. natrieg</i>	

#### 4. Caractères bactériologiques

Les *Vibrio* sont des bacilles ou coccobacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8 µm et d'une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 µm.

Ils présentent habituellement à l'état frais une mobilité polaire due à un seul flagelle tel que *Vibrio cholerae* qui présente un flagelle « engainé » dans la paroi caractéristique mais certaines souches possèdent plusieurs flagelles latéraux lorsqu'elles poussent sur un milieu solide en particulier pour l'espèce *Vibrio parahaemolyticus* (Twedt R.M., 1989).

## 5. Caractères culturaux

Les membres du genre *Vibrio* sont anaérobies facultatifs, chimiorganotrophes et peuvent utiliser le métabolisme respiratoire ou fermentatif. Ils ne prennent pas la coloration de Gram (gram négatif) et poussent généralement bien sur milieux ordinaires, à des températures de 18° à 37°C et un PH de 6 à 9. Ils fermentent les hydrates de carbone sans production de gaz (ni CO<sub>2</sub>, ni H<sub>2</sub>O). Ils réduisent les nitrates en nitrite et libèrent l'acétone (VP+). Ils produisent une oxydase (excepté *V metschnikovi* et *V gazogenes*) et une catalase, ils fermentent le glucose sans production de gaz, à l'exception de *V. fluvialis* (Holt et al., 1994).

Les solutions ioniques stimulent la croissance de toutes les espèces et sont absolument indispensables pour la plupart des espèces excepté *Vibrio cholera* et *Vibrio mimicus* qui peuvent croître dans un milieu contenant 0% de NaCl (Holt et al., 1994).

Ainsi les dix espèces de *Vibrio* connues pour causer des gastro-entérites peuvent être classées en cinq sous-groupes sur la base de sept tests (Twedt R.M, 1989) (cf tableau 19).

## 6. Importance des différentes espèces de *Vibrio*

### 6.1. *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 sont les deux seuls considérés comme étant les agents du choléra d'après la définition donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Des différences de composition des glucides présents dans l'antigène somatique thermorésistant de surface (antigène O) sont à la base de la classification sérologique de *Vibrio cholerae*. Ces sérogroupes sont détectés grâce à des antisérums O1 et O139 (Bonhomme. A, 2003).

La prévalence de ces sérogroupes dans les environnements aquatiques semble inférieure à celle des autres sérogroupes de *V cholerae*. Le nombre de sérogroupes O recensés continue d'augmenter et actuellement plus de 206 sérogroupes O sont reconnus (Shimada et al., 1994). Depuis la reconnaissance du séro groupe O139, la désignation *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139 a été utilisée pour inclure tous les autres sérogroupes de *V. cholerae* exceptés O1 et O139. Ces souches non-O1 et non-O139 sont occasionnellement isolées de cas de diarrhée bénigne et d'infections extra-intestinales.

Parmi l'espèce *V. cholerae* O1, deux biovars sont distingués : « classique » et « El Tor », ce dernier étant capable de provoquer l'hémolyse d'érythrocytes de mouton.

Trois sérotypes sont décrits dans les deux biotypes du séro groupe O1 : et sont Inaba, Ogawa et (plus rarement) Hikojima (Bonhomme. A, 2003).

La détermination du sérotype Inaba, Ogawa ou Hikojima, est encore souvent considérée à tort comme utile, voire indispensable. Cette détermination n'a en fait qu'un intérêt très limité puisque l'étude de la génétique du lipopolysaccharide de *Vibrio cholerae* O1, qui est le support moléculaire du sérotype, a montré

qu'une souche pouvait passer facilement d'un sérotype à l'autre et donc qu'un changement de sérotype au cours d'une épidémie ne signifiait pas obligatoirement l'arrivée d'une nouvelle souche (Bonhomme. A, 2003), (cf tableau 4).

**Tableau 4**

Position du vibrion cholérique (*Vibrio cholerae* O1 et O139) au sein de l'espèce *Vibrio cholerae* (Fournier J.M, 1996).

Classement selon L'antigène O*	Sérotypes	Classement selon le biotype	Pouvoir pathogène
Sérogroupe O1	Inaba ou Ogawa**	Classique	Vibrion cholérique
	Inaba ou Ogawa**	El Tor	Vibrion cholérique
O139		El Tor	Nouvelle souche de Vibrion cholérique apparue en 1992 en Inde et au Bangladesh
Non- O1 non-O139 (plus de 155 Sérogroupe)			Vibrions responsables de diarrhées saisonnières, de suppurations et de septicémies.

\*Déterminé selon la réactivité immunologique de la partie polysaccharidique spécifique du lipopolysaccharide.

\*\*Le sérotype Hikojima correspond à une transition entre les sérotypes Ogawa et Inaba.

\*\*\*Déterminé selon quelques caractères biochimiques.

## **6.2. *Vibrio parahaemolyticus***

Une étude réalisée chez des volontaires a montré que l'ingestion de  $2 \times 10^5$  à  $3 \times 10^7$  UFC provoquait des gastro entérites dont les isolats étaient hémolytiques (hémolyse de type  $\beta$ ) sur un milieu spécial contenant des érythrocytes humains (gélose Wagatsuma), tandis que ceux qui provenaient de l'eau de mer et des poissons ne l'étaient pas. L'hémolysine extracellulaire thermostable (TDH) responsable de cette différence est désignée comme « phénomène Kanagawa» (Honda et al., 1988).

Cette discordance s'expliquerait par une meilleure multiplication des souches Kanagawa-positives dans l'intestin. Il est également possible que les souches Kanagawa-négatives survivent mieux dans le milieu extérieur où elles seraient donc plus abondantes (Jonhson D.E et al., 1984).

Gosh et Sehgal, (1998) ont complété une étude réalisée par Honda et al., (1988) qui avait mis en évidence une autre hémolysine thermostable, appelée TDH-apparentée (TRH) décrite pour des souches de *Vibrio parahaemolyticus* négatives au phénomène Kanagawa. Elle est connue pour jouer un rôle important dans l'origine des diarrhées.

Les gènes TDH et TRH de ces deux hémolysines sont aujourd'hui connus et considérés comme d'importants gènes de virulence (Bates T.C et al., 2004).

## **6.3. *Vibrio vulnificus***

Concernant *Vibrio vulnificus*, trois biogroupes sont distingués.

Le biotype 1 a été décrit à l'origine comme étant un *Vibrio* «lactose-positif». Une étude récente a mis en évidence qu'environ 85% des souches cliniques associées à des cas de maladies humaines étaient « lactose-positives » (Oliver et Kaper, 1997).

Les souches appartenant au biotype 2 sont une cause majeure de maladie pour les anguilles.

Ce biotype a été impliqué en tant que pathogène opportuniste de façon sporadique dans des cas d'infections humaines (Oliver et Kaper, 1997).

Un troisième biotype de *V. vulnificus* qui est associé à des cas de bactériémie transmise par des produits de la mer et à des infections de blessures rencontrées chez 62 patients qui avaient été en contact avec les œufs de poissons d'élevage en Israël.

Grâce à des méthodes d'hybridations ADN/ADN, des études comparatives ont été menées sur les souches cliniques et environnementales. Il s'est avéré que ces souches sont pratiquement identiques (Bisharat et al ., 1999).

## **7. Facteurs de virulence et d'adhésion**

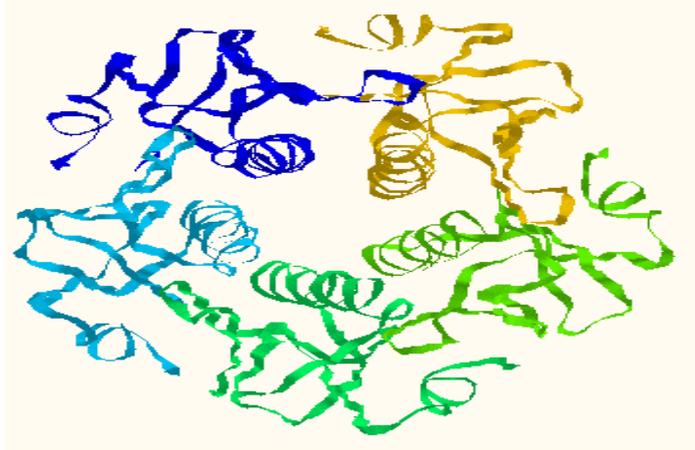
### **7.1. *Vibrio cholerae***

#### **7.1.1. Facteurs de virulence**

Il a été prouvé récemment que la bactérie responsable du choléra, est rendu pathogène par un de ses parasites astucieux, le bactériophage *CTX*. Ce virus rend le vibron capable de produire une enterotoxine (*CT*) qui provoque les diarrhées mortelles du choléra. Pour parasiter le vibron cholérique, le bactériophage *CTX* intègre l'ensemble de son génome dans celui de la bactérie, ce qui lui permet de profiter de la multiplication de son hôte pour se propager. En échange, le vibron acquiert la capacité à produire la toxine cholérique qui est encodée dans le génome du phage (Val M.E et al ., 2005).

Le génome de la plupart des bactéries, et notamment celui du vibron cholérique, est composé de chromosomes circulaires d'ADN double brin. Le génome du phage *CTX* se présente lui sous la forme d'un ADN circulaire simple brin. Les chercheurs du CNRS et de l'Institut Pasteur ont récemment mis en évidence le mécanisme par lequel le phage *CTX* « pirate » la machinerie cellulaire de la bactérie pour permettre l'intégration de son génome malgré cette différence de structure (Val M.E et al ., 2005).

Considérée comme le principal facteur de virulence connu de *Vibrio cholerae*, la toxine est une protéine polymère (M. 84.000) qui se compose de deux domaines ou régions principales. La région A (M. 28.000), responsable de l'activité biologique de l'entérotoxine, est liée par des interactions noncovalentes avec la région de B (M. 56.000). La région B est composée de cinq sous-unités B (pour «binding»), (11 kg.mol<sup>-1</sup>) (figure 1), entourant la région A (pour « active »), (de 29,5 kg.mol<sup>-1</sup>), elle-même divisée en sous-unités A1 et A2 liées par un pont disulfure.



**Figure 1:** Structure de la toxine B (Bernard et al., 2007)

Une autre caractéristique des souches de *Vibrio cholerae* O139 est qu'elles possèdent une capsule polysaccharidique visible en microscopie électronique. Cette capsule pourrait accroître leur virulence. Les souches de *V. cholerae* non-O1 et non-O139, qui peuvent provoquer des septicémies chez les sujets immunodéprimés, sont d'ailleurs capsulées. Un autre rôle connu des capsules polysaccharidiques est de protéger les bactéries contre la dessiccation. Il est possible qu'une telle propriété contribue à la meilleure survie dans l'environnement de *V. cholerae* O139 comparativement à *V. cholerae* O1. Cette meilleure survie pourrait prolonger l'existence de foyers d'endémie à *V. cholerae* O139 (Fournier J.M, 1996).

Les souches O1 et O139 produisent une toxine cholérique et d'autres facteurs de virulence tandis que les souches non-O1 et non-O139 possèdent rarement ces attributs. En revanche, ils possèdent d'autres facteurs de pathogénicité qui sont à l'origine de différents syndromes observés lors des infections qu'ils provoquent. Ces facteurs peuvent être classés en trois catégories:

Les entérotoxines, les hémolysines et les capsules polysaccharidiques. (Fournier et Quilici, 2002).

Une minorité de souches de *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139 produit une entérotoxine thermostable (ST) dont la séquence présente 50% d'homologie avec l'entérotoxine Sta des souches entérotoxinogènes d'*Escherichia coli*. En revanche, la plupart des souches de *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 produit une hémolysine/cytolysine identique à celle produite par les souches de *Vibrio cholerae* O1, biotype El Tor. Environ 70% des souches de *Vibrio*

*cholerae* non-O1 et non-O139 possèdent une capsule polysaccharidique qui augmente la résistance des bactéries à la phagocytose et leur permet de provoquer des septicémies (Fournier et Quilici, 2002).

### **7.1.2. Facteurs d'adhésion**

*Vibrio choléra* ont un ou plusieurs facteurs d'adhérence qui leur permettent d'adhérer aux microvilli. Plusieurs hémagglutinines et le pili de toxine-coregulated semblent être impliqués dans l'adhérence mais le mécanisme réel n'a pas été défini. En effet, il peut y avoir de multiples mécanismes. La motilité des *Vibrio* peut toucher la virulence en leur permettant de pénétrer la couche du mucus (Bonhomme. A, 2003).

## **7.2. *Vibrio parahaemolyticus***

### **7.2.1. Facteurs de virulence**

Twedt R.M., 1989, a mis en évidence quatre agents hémolytiques synthétisés par *V. parahaemolyticus*. Une hémolysine thermostable directe (TDH), une hémolysine apparentée à l'hémolysine thermostable directe (TRH), une phospholipase A et une lysophospholipase. Cependant Le rôle exact des deux autres facteurs identifiés, la phospholipase A et la lysophospholipase n'est pas connu et aucune relation entre leur production et le pouvoir pathogène des souches de *Vibrio parahaemolyticus* n'a été établie (Fournier et Quilici., 2002).

#### La toxine TDH

L'hémolysine thermostable directe a été purifiée, c'est une protéine de 23 kDa qui montre une activité hémolytique sur divers types d'hématies. Cette activité n'est pas inactivée par un traitement à 100°C pendant 10 minutes, (Honda. T et Iida. T, 1993), elle est composée de deux sous-unités monomériques de 22000 Daltons.

Sa production est sous contrôle du pH, elle intervient uniquement lorsque celui-ci est compris entre 5,5 et 6,5 (Twedt R.M., 1989).

La dose minimale hémolytique de cette hémolysine purifiée est de 0,1 µg.

#### La toxine TRH

La toxine TRH est une protéine de 23 kDa immunogénétiquement liée à la toxine TDH (Honda *et al.*, 1988). TRH est moins thermorésistante que TDH. Le gène *trh* montre 69% d'identité avec le gène *tdh2*. Il semble que les gènes *trh* et *tdh* ont évolué à partir d'un ancêtre commun. La toxine thermolabile ne semble pas liée à la virulence mais le gène *tl* est présent dans toutes les souches de *V. parahaemolyticus* ce qui en fait un bon marqueur épidémiologique (Bonhomme. A, 2003).

### **7.2.2. Facteurs d'adhésion**

D'autres études réalisées par Honda et al., 1976 et Twedt R.M, 1989 ont montré que *Vibrio parahaemolyticus* est capable de pénétrer dans la lamina propria de l'iléon et de se disséminer par la circulation au cœur, à la rate, au pancréas et au foie, démontrant ainsi la capacité invasive de cette bactérie.

## **7.3. *Vibrio vulnificus***

### **7.3.1. Facteurs de virulence**

Les substances pouvant jouer un rôle dans la virulence de cette bactérie sont : des sidérophores, une cytolysine, une capsule, une protéase, une élastase, des collagénases, des ADNases, et des lipases qui possèdent une activité hémagglutinante et qui peuvent adhérer aux cellules épithélio-buccales humaines (China B., 2003, Bonhomme. A, 2003).

En 1981, Kreger et Lockwood ont été les premiers à décrire la production d'une toxine extracellulaire et thermolabile par *Vibrio Vulnificus* (Oliver J.D, 1989).

*V. vulnificus* semble capable de provoquer des septicémies quelques jours après l'ingestion de fruits de mer contaminés. Cette septicémie est particulièrement sévère puisque le taux de mortalité est de 50 %. C'est un pathogène associé aux huîtres. Des études récentes par électrophorèse en champs pulsés ont montré qu'une douzaine d'huîtres peut contenir plus de 100 souches différentes dont seules certaines sont pathogènes pour l'homme (Jackson *et al.*, 1997).

L'importance du fer pour ce micro-organisme a été mise en évidence par le fait que le sérum normal humain s'est montré être bactéricide en quelques heures tandis que lorsque la concentration sérique en fer augmentait, le sérum permettait à *V. vulnificus* de survivre et ensuite de croître.

*V.vulnificus* produit deux sidérophores :

La vulnibactine (un sidérophore de la famille des phénolate) et un sydérophore de la famille des *vulnificus* (Okujo et al ., 1996).

Il est probable que *V. vulnificus* soit capable de rompre la liaison entre l'hémoglobine et le fer, ce qui constitue une grande différence avec les autres bactéries qui, elles sont incapables d'acquérir le fer lorsque celui-ci est complexé à l'haptoglobine. Des souches avirulentes de *V.*

*vulnificus* se sont montrées incapables d'obtenir le fer depuis la transferrine saturée, ce qui suggère que le fer est un facteur déterminant dans la pathogenèse.

## **7.4. Autres espèces de *Vibrio***

### **7.4.1. Facteurs de virulence**

Dans une étude examinant la présence de caractéristiques de virulence pour plusieurs espèces de *Vibrio* isolées dans l'eau de mer, les activités enzymatiques et biologiques ont été étudiées sur des animaux par Baffone et al., 2001.

Les souches étudiées étaient *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* et *V. metschnikovii*. Les activités enzymatiques réputées être corrélées à la virulence de *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* ont été testées (uréase, lipase, gélatinase et activité hémolytique). L'activité uréase est trouvée chez 19,9% des souches étudiées. Les valeurs sont situées entre 5% pour *V. alginolyticus* et 100% pour *V. metschnikovii*. La lipase (98%) et la gélatinase (100%) sont observées pratiquement pour toutes les souches. L'activité hémolytique n'est présente que pour 7,2% des souches.

La capacité d'adhésion concernait 40% des souches de *V. fluvialis* et entre 55 et 80% pour *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* non-O1. La cytotoxicité est notée pour plusieurs espèces avec cependant une distribution et une intensité variables pour les différentes espèces. 50% des souches de *V. alginolyticus* étaient cytotoxiques mais 15% l'étaient de façon moyenne à importante tandis que 80% des souches de *V. parahaemolyticus* et 100% des souches de *V. cholerae* non-O1 étaient fortement productrices de cytotoxines. Des propriétés cytotoxiques ont également été mises en évidence pour *V. vulnificus* et *V. metschnikovii* mais avec une intensité moyenne à faible. *V. fluvialis* et *V. furnissii* ne sont pas producteurs de cytotoxines. (cf tableau 5).

**Tableau 5**

Distribution en pourcentages des activités enzymatiques et biologiques de 52 souches de *Vibrio* halophiles issues de l'eau de mer (Baffone et *al.*, 2001)

Espèces	Uréase	Lipase	Gélatinase	Hémolysine	Adhérence	Cytotoxicité	Test sur ileon ligaturé	Test sur animal
<i>V. parahaemolyticus</i>	40	100	100	10	80	90	30	60
<i>V. cholerae non-O1</i>	40	80	100	0	80	100	20	40
<i>V. alginolyticus</i>	5	100	100	0	55	50	5	5
<i>V. vulnificus</i>	20	100	100	20	60	0	40	20
<i>V. fluvialis</i>	0	100	100	0	40	0	20	0
<i>V. furnissii</i>	20	100	100	20	60	0	40	20
<i>V. metschnikovii</i>	100	100	100	50	100	100	100	0
Total	19,2	98	100	7,2	63	57,6	23	23

## 8. Pathogénie

### 8.1. *Vibrio cholera*

Les effets de la toxine cholérique sont une diarrhée massive mais il faut que le micro-organisme ait échappé au préalable à de nombreux mécanismes de défense non-spécifiques de l'hôte pour réussir à coloniser l'intestin grêle. Aussi les souches entérotoxiques de *V. cholerae* doivent-elles être capables de survivre à l'acidité de l'estomac, de coloniser l'intestin et d'excréter suffisamment de toxine cholérique pour produire la réponse diarrhéique associée au choléra ? Les effets de l'acidité sur *V. cholerae* ont été étudiés grâce à une expérimentation réalisée sur des volontaires Nord-Américains en bonne santé qui ont ingéré 1 million de cellules de *V. cholerae* dans de l'eau contenant du bicarbonate de sodium tous ont développé le choléra. Dans une même étude effectuée sans bicarbonate, aucun des volontaires humains n'a été malade. Après avoir survécu à l'acidité gastrique, *V. cholerae* doit être capable d'adhérer à la muqueuse intestinale et donc de résister au péristaltisme intestinal créant un flux hydrodynamique et à la barrière muqueuse (le glycocalyx) qui empêche les bactéries d'avoir un accès direct à la muqueuse intestinale. Pour y parvenir, *V. cholerae* produit des adhésines lui permettant une adhérence directe sur les cellules et des enzymes (les mucinases) qui dégradent partiellement les glycoprotéines composant le glycocalyx. Il existe des bactéries possédant des toxines immunologiquement apparentées à *Vibrio cholera* et qui provoquent des troubles comparables. Il s'agit de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* (Bonhomme. A, 2003).

### 8.2. *Vibrio parahaemolyticus*

La TDH altère le flux d'ions intestinaux entraînant une diarrhée. La protéine purifiée induit la sécrétion d'ions en utilisant le  $Ca^{2+}$  comme second message (Raimondi *et al.*, 1995; Raimondi *et al.*, 2000). Le récepteur cellulaire pour TDH semble être le ganglioside GT1b (Olivier et Kaper, 1997).

Les souches hémolytiques de *V. parahaemolyticus* contiennent deux copies différentes du gène *tdh* (*tdh1* et *tdh2*). Les souches faiblement hémolytiques ne possèdent qu'une seule copie du gène et les souches non-hémolytiques ne possèdent pas de gène *tdh*. Un gène *tdh-like* est trouvé aussi dans d'autres espèces de *Vibrio* (Nishibuchi et Kaper, 1995).

## **9. Symptomatologie des infections à *Vibrio***

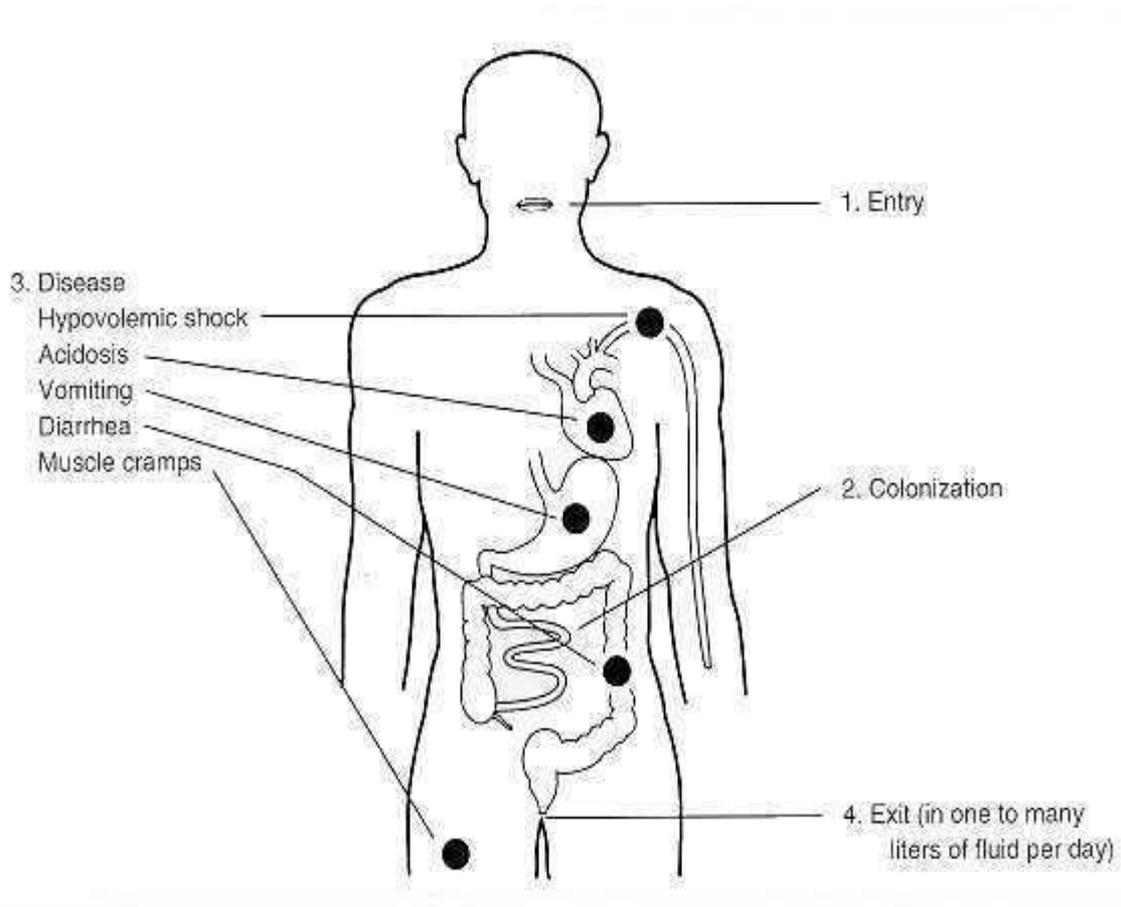
### **9.1. *Vibrio cholera***

*Vibrio cholerae* O1 et O139 sont les agents responsables du « vrai » choléra. Les syndromes provoqués par ces deux bactéries ne peuvent être distingués.

L'incidence du choléra chez les patients de groupe sanguin A est plus faible que pour la population générale et l'incidence pour les personnes du groupe O est significativement plus importante (FAO/WHO, 2001).

Après une période d'incubation variant de 6 heures à cinq jours, les premiers symptômes observés lors d'infection évoluent d'une diarrhée légère à une diarrhée aiguë accompagnée de douleurs abdominales et de l'anorexie.

Le choléra se manifeste par une forte diarrhée, des vomissements, sans élévation de la température. Les selles, fécaloïdes au début, deviennent rapidement aqueuses, caractéristiques «d'eau de riz». Il y'a une perte rapide et importante des fluides corporels (plus de un litre par heure) et des sels minéraux (en particulier le potassium), conduisant à une déshydratation sévère, de l'hypotension et un déséquilibre ionique. Cette importante fuite d'eau et d'électrolytes entraîne des crampes musculaires très douloureuses ainsi qu'une soif intense impossible à calmer du fait des vomissements (cf. figure 2), (Bonhomme. A, 2003).



**Figure 2:** Schéma pathophysiologique du choléra (Richard A, Finkelstein, 2007).

**1:**Après ingestion de l'aliment contaminé par la bouche,

**2:**La colonisation a lieu au niveau du colon

**3:**La toxine cholérique provoque la maladie du cholera qui se traduit par :

- Le choc hypovolemique
- Une acidose
- Des vomissements
- Une diarrhée
- Des crampes musculaires

**4:**Perte de 1 à plusieurs litres par jour

A côté de cette forme clinique classique, il existe un choléra «sidérant» ou «sec» dans lequel une chute brutale de la tension entraîne la mort par collapsus alors qu'il n'y a pratiquement pas eu de diarrhée. Dans ces formes d'évolution très rapide, qui surviennent généralement chez les enfants, les sécrétions intestinales restent confinées dans l'intestin grêle et un côlon distendus.

Une autre forme de choléra, appelée «cholérine», plus difficile à diagnostiquer, mais dont l'évolution est moins grave, présente tous les signes du choléra mais sous une forme atténuée et d'évolution plus lente. La déshydratation est moins importante et la guérison survient spontanément en quelques jours (Fournier J.M., 1996).

Les infections à *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139 se manifestent le plus souvent par des gastro-entérites fébriles à sévérité modérée après une période d'incubation moyenne de 48 heures. Les symptômes prédominants incluent une diarrhée, des crampes abdominales, de la fièvre. Les vomissements et la nausée concernent 25% des individus infectés. La même proportion présente du sang et du mucus dans les selles. Parfois, la diarrhée est assez sévère et peut durer 6 à 7 jours. La dose minimale infectante n'est pas connue mais supposée être supérieure à 1 million (Bonhomme. A, 2003).

## **9.2. *Vibrio parahaemolyticus***

Après une durée d'incubation de 4 à 96 heures, Les symptômes associés à une infection à *Vibrio parahaemolyticus* consistent le plus souvent en une gastro-entérite qui se résout d'elle-même en deux à trois jours. Les signes cliniques les plus courants sont la diarrhée (98%), des crampes abdominales (82%), des nausées (71%), des vomissements (32%), des maux de tête (42%), une fièvre légère (27%) et des frissons (24%). Une forme dysentérique plus sévère de la maladie avec des selles présentant du mucus et du sang a été décrite en Inde, au Bangladesh et aux USA. Même si les cas graves peuvent nécessiter une hospitalisation, la majorité est souvent soignée par une thérapie qui associe la réhydratation et parfois des antibiotiques (tétracycline). La durée de la maladie se situe entre deux heures et dix jours (Bonhomme A, 2003).

### 9.3. Autres *Vibrio*

Les infections dues à *Vibrio vulnificus* interviennent plus fréquemment chez les hommes de plus de cinquante ans. D'après l'étude de cas cliniques, plus de 80% des personnes affectées par cette bactérie appartiennent à ce groupe (European Commission, 2001).

Les symptômes les plus fréquents sont la fièvre, des frissons, la nausée et une hypotension sévère aboutissant au collapsus cardio-vasculaire. Dans 69% des cas de septicémies primaires après ingestion du micro-organisme, des lésions secondaires peuvent apparaître suite probablement à la dissémination de la bactérie par la circulation générale. Ces lésions apparaissent généralement sur les extrémités et deviennent fréquemment nécrotiques. Les tissus affectés montrent une nécrose des vaisseaux de la peau et des muscles et nécessitent souvent un débridement chirurgical voire l'amputation du membre (Oliver J.D., 1989).

L'infection à *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio hollisae* n'aboutit qu'assez rarement à une forme clinique cependant elles sont responsables de symptômes plus sévères pouvant conduire à des septicémies fatales chez les individus immunodéprimés (Fournier et Quilici, 2002).

L'infection asymptomatique étant la forme la plus habituelle d'infection. Les facteurs d'hôte semblent importants (personnes âgées, immunodéficience, cirrhose du foie, cancer, traitement par les immunosuppresseurs, diabète)

Les gastro-entérites provoquées par *Vibrio mimicus* sont similaires à celles produites par *V. cholerae* non O1 et non-O139. Elles sont caractérisées par de la diarrhée, des vomissements, des crampes abdominales et de la fièvre, des maux de tête et parfois du sang dans les selles. Le délai d'incubation est de 3 à 72 heures après ingestion de nourriture contaminée et la durée de la maladie est de 1 à 10 jours, 6 en moyenne (ICMFS, 1996).

Les symptômes de la gastro-entérite attribuée à *V. fluvialis* sont similaires à ceux causés par *Vibrio cholerae*. Les patients présentaient une diarrhée aqueuse avec des vomissements, des douleurs abdominales, une déshydratation sévère et souvent de la fièvre. Une différence notable par rapport au choléra est l'occurrence plus fréquente de la présence de sang dans les selles lors d'infection à *V. fluvialis* (Han et al., 2002).

*Vibrio hollisae* est responsable de gastro-entérites liées à la consommation de produits de la mer et rarement de septicémies (Fournier J.M. et al., 2002), (cf. tableau 6).

**Tableau 6**

Formes cliniques, facteurs de transmission et facteurs de risque des infections à *Vibrio* non cholériques (Fournier et Quilici, 2002).

Micro-organisme	Véhicules de Transmission	Formes cliniques principales	Facteurs de risque chez l'hôte
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 et non-O139	Fruits de mer Eau de mer	Gastroentérite Otite, infection des tissus mous, septicémie	Non connus Plaie, cirrhose, immunodéficience
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	Fruits de mer	Gastroentérite	Non connus
<i>Vibrio vulnificus</i>	Eau de mer	Infection des tissus Mous, septicémie	Plaie, cirrhose, hémochromatose, immunodéficience, diabète
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Eau de mer	Otite, infection des Tissus mous	Plaie, perforation du tympan, otite préexistante
<i>Vibrio fluvialis</i>	Fruits de mer	Gastroentérite	Non connus
<i>Vibrio hollisae</i>	Fruits de mer	Gastroentérite, Septicémie	Non connus, cirrhose
<i>Vibrio mimicus</i>	Fruits de mer Eau de mer	Gastroentérite Otite	Non connus Perforation du tympan, otite préexistante



**Photo 1:** Infections causées par *Vibrio vulnificus* ( Kuhnt-Lenz.K et al.,2004 )

## 10. Traitement

Pour le cholera le traitement de base est la réhydratation d'urgence (Aubry .P, 2007).

Elle est réalisée soit:

- Par voie veineuse dans la forme grave du cholera , par perfusion d'un liquide isotonique, riche en bicarbonates, riche en potassium, le liquide de Ringer lactate est bien adapté à la réhydratation,

- Par voie orale d'emblée en l'absence de vomissements importants ou, dès que possible, dans la forme grave avec les sels de réhydratation orale (SRO) présentés sous forme de sachets standards OMS/UNICEF. Les SRO contiennent du glucose (20,0 g/l), du sel (NaCl: 3,5 g/l), du potassium (KCl : 1,5 g/l) et au choix, du citrate disodique déshydraté (2,9 g/l) ou du bicarbonate de sodium (2,5 g/l). Le soluté retenu par l'OMS est particulièrement adapté en cas de choléra (un rapport sodium / glucose de 4 pour 1, avec une osmolarité de 311 mmol/l environ), (Ndour C.T et al., 2006).

Il faut lutter contre le vibron et insister sur la résistance actuelle de *Vibrio cholerae* O1 aux antibiotiques, en particulier au cotrimoxazole et au chloramphénicol. La souche isolée à Madagascar (similarité avec les souches isolées en Afrique et aux Comores depuis respectivement 1994 et 1998) est sensible à la tétracycline, à l'ampicilline, à la céfalotine et à la pefloxacin. Mais des souches de *V. cholerae* O1 isolées en Asie et en Afrique sont résistantes à la plupart des antibiotiques, y compris aux cyclines. Une souche multi résistante de *Vibrio cholerae* a été découverte à Madagascar en février 2000. ( Rakoto Alison A.O et al., 2001).

Pour les autres *Vibrio*, si *V. vulnificus* est suspectée, le traitement doit être entamé immédiatement parce que les antibiotiques augmentent les chances de survie. Un traitement de choc doit être donné au lieu de la blessure. L'amputation de la chair infectée est quelque fois nécessaire. Des mesures cliniques pour le management de l'infection par *V. vulnificus* n'ont pas été conduites.

Pour le *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus* et les autres *Vibrio* le traitement n'est pas nécessaire dans la plupart des cas de l'infection de *V. parahaemolyticus* il n'y a aucune

évidence que le traitement antibiotique diminue la sévérité ou la longueur de la maladie. Les patients devraient boire l'abondance des liquides pour remplacer des fluides perdus par la diarrhée. Dans des maladies graves ou prolongées, des antibiotiques tels que la tétracycline, l'ampicilline ou le ciprofloxicin peuvent être employés. Le choix des antibiotiques devrait être basé sur des susceptibilités antimicrobiens de l'organisme (CDC, 2005a).

Il est difficile de donner un aperçu de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Vibrio parahaemolyticus* car elle varie selon les pays et, pour un même pays, des modifications sont observées au cours du temps (en 1995, neuf souches isolées aux Philippines étaient sensibles à la céfalotine; en 2001, 94% des 35 souches isolées dans ce pays étaient résistantes à cet antibiotique). De plus, la concentration en NaCl des milieux utilisés est susceptible de modifier les résultats soit en agissant sur la perméabilité membranaire soit en entravant la diffusion des antibiotiques. Selon Ottaviani *et al.*, (2001), la concentration en NaCl doit toujours être inférieure à 4% et ces auteurs préconisent l'utilisation d'un milieu de Mueller-Hinton contenant 1% de NaCl. La majorité des souches est sensible à l'imipénème, au méropénème, au chloramphénicol, à la gentamicine, à la nitrofurantoïne, à la tétracycline, à la doxycycline, à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et aux fluoroquinolones. Une résistance est observée vis-à-vis de la pénicilline, de l'ampicilline, de la carbénicilline, de la clindamycine, de la lincomycine, de la colistine et de l'érythromycine.

## **11. Facteurs de développement**

Les facteurs de développement de *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* sont résumés dans les tableaux 7, 8, 9.

## 11.1. Température

### 11.1.1. *Vibrio cholerae*

Les études concernant la survie de *V. cholerae* dans les aliments ou sous diverses conditions physiques défavorables datent des années 1880.

Le délai avant le début de la croissance sur un support alimentaire peut être inférieur à une heure lorsque la température est de 35°C, ce délai est légèrement supérieur à une température ambiante (22°C). Le temps de doublement peut être inférieur à une heure à 22°C et aussi faible que 18 minutes à 37°C (ICMSF, 1996).

*Vibrio cholerae* ne survit que un à deux jours à 28-30°C et 1 à 5 jours à 4°C dans des produits secs (céréales, biscuits). En 1959, Pollitzer a montré que cette bactérie peut survivre dans les huîtres et les palourdes vivantes pendant au moins un mois et demi. *V. cholerae* est sensible à la chaleur (>45°C), mais cette sensibilité dépend beaucoup du milieu.

### 11.1.2. *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* peut se multiplier dans une large gamme de températures, qui peut être modifiée selon les valeurs du pH et la concentration en NaCl (Twedt R.M, 1989).

La remarquable capacité de croître de cet organisme, aussi bien dans les milieux conventionnels que dans les aliments, est mise en évidence par son temps de génération.

En effet, à 37°C en milieu de culture ayant une concentration en NaCl de 2,5%, celui-ci peut être aussi faible que 8 à 9 minutes.

La multiplication dans les produits de la mer est également très rapide : 13 minutes à 37°C et 15 à 18 minutes à 30°C. Ainsi, une concentration initiale de 10<sup>2</sup> cellules par gramme dans un poulpe peut augmenter jusque 10<sup>7</sup> ou 10<sup>8</sup> cellules par gramme en six heures à 30°C (ICMSF, 1996).

D'autres expériences ont montré que lorsque 10<sup>4</sup> bactéries par gramme sont inoculées sur la surface de crabes et crevettes cuits conservés à 25°C, *Vibrio parahaemolyticus* peut croître et atteindre des concentrations de 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> cellules par gramme en quelques heures. Sur un homogénat d'huître conservé à 12°C, la concentration de cet organisme est passée de 5×10<sup>3</sup> cellule par gramme à 5×10<sup>8</sup> en une semaine. *V. parahaemolyticus* est assez sensible au froid:

Le taux de mortalité est maximal entre 0 et 5°C. Le micro-organisme est modérément sensible à la congélation et peut ainsi persister dans des produits de la mer congelés pendant de longues périodes (ICMSF, 1996).

### **11.1.3. *Vibrio vulnificus***

Cet organisme est sensible aux basses températures et à la chaleur.

Cook D.W, (1997) a observé une multiplication par un facteur 10 à 100 en dix heures dans des huîtres conservées à température ambiante après leur récolte. La durée requise pour que ce micro-organisme meure lorsqu'il est conservé à de faibles températures est de 21 jours dans des huîtres à 5°C (Bang et Drake, 2002).

Bryan et al., (1999) ont montré que *V. vulnificus* est plus résistant à une congélation sous -78°C s'il a subi auparavant une adaptation à 15°C avant d'être conservé à 6°C.

## **11.2. pH**

Les bactéries du genre *Vibrio* sont relativement sensibles au pH, et il a été montré que lorsque celui-ci diminue, la sensibilité à la chaleur diminue également.

*V. cholerae* est sensible à l'acidité: sa survie dans un aliment dont le pH est inférieur à 4,5 est généralement inférieure à 12 heures à 25-30°C (ICMFS, 1996).

## **11.3. L'activité de l'eau (a<sub>w</sub>)**

### **11.3.1. *Vibrio cholerae* et *Vibrio mimicus***

La survie de *V.cholerae* et *V.mimicus* dans les aliments secs est inférieure à douze heures (Bonhomme. A, 2003).

### **11.3.2. *Vibrio. parahaemolyticus***

*Vibrio parahaemolyticus* est rapidement inactivé par l'eau distillée. L'activité de l'eau maximale est estimée entre 0,997 et 0,999. La concentration optimale en NaCl est de 3% correspondant à une activité de l'eau de 0,992. L'a<sub>w</sub> minimale est de 0,948 ce qui correspond à une concentration de NaCl de 8%. Il semblerait que quelques souches soient capables de croître très faiblement entre 8 et 10% et très rarement à 13% de NaCl (Twedt R.M, 1989).

### **11.3.3. *Vibrio vulnificus***

*Vibrio vulnificus* est qualifié comme étant «modérément halophile» relativement à *V.parahaemolyticus*. La survie de *V. vulnificus* a été étudiée en utilisant des souches inoculées dans de l'eau stérilisée dont la salinité a été ajustée avec de l'eau déminéralisée. A 14°C, entre 0,5 et 2,5% de NaCl, les souches avaient tendance à croître sur une durée de six jours tandis que pour des salinités plus importantes : 3,0 à 3,8%, une réduction du nombre des cellules a été observée sur une même période (Bonhomme. A, 2003).

**Tableau 7**

Facteurs de développement de *Vibrio cholerae*  
(Madden et Mc Cardell, 1989)

	Optimum	Extrêmes
Température (°C)	37	10-43
PH	7,6	5,0-9,6
Activité de l'eau a <sub>w</sub>	0,984	0,970-0,998
Atmosphère	Aérobie	Aéro-anaérobie
NaCl %	0,5	0,1-4,0
Sensibilité à la chaleur	D60°C 2,65min	>48°C

**Tableau 8**

Facteurs de développement de *Vibrio parahaemolyticus* (Twedt R.M, 1989)

	Optimum	Extrêmes
Température (°C)	37	5-43
Ph	7,8-8,6	4,8-11
a <sub>w</sub>	0,981	0,940-0,996
Atmosphère	Aérobie	Aéro-anaérobie
NaCl %	3	0,5-10

**Tableau 9**

Facteurs de développement de *Vibrio vulnificus* (Oliver J.D, 1989)

	Optimum	Extrêmes
Température (°C) 37	37	13-43
PH	7,8	5-10
a <sub>w</sub>	0,98	0,96-0,997
Atmosphère	Aérobie	Facultatif
NaCl %	2,5	0,5-5,0

## 12. Prévention et maîtrise du risque à *Vibrio*

La prévention du choléra repose avant tout sur l'élévation du niveau d'hygiène. La chimioprophylaxie n'a qu'une efficacité limitée dans le temps. L'emploi de doxycycline en prévention à Madagascar s'est traduit par l'apparition de souches résistantes repérées dès février 2000.

### 12.1. Le vaccin

Il existe à ce jour trois vaccins anticholériques oraux dont l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité ont été démontrées.

- Un vaccin oral inactivé constitué de bactéries entières tuées (*V. cholerae O1*) et de la sous-unité B de la toxine cholérique purifiée obtenue par génie génétique (WC/rBS), produit en Suède (Dukoral®). Il est présélectionné par l'OMS. Il est administré par voie buccale en deux doses à huit jours d'intervalle. Il entraîne une protection de 85 à 90% pendant six mois chez tous les vaccinés, (Ragot C., et al., 2006).

- Une variante du vaccin WC/rBS ne contenant pas de sous-unité B produit par génie génétique au Vietnam et utilisé qu'au Viêt-Nam,

- Un vaccin oral atténué contenant une souche de *V. cholerae O1* atténuée, vivante et génétiquement modifiée (CVD 103HgR) produit en Suisse (Orochol®). Il est administré par voie buccale en une seule dose. Il confère une protection élevée (95%) contre *V. cholerae* classique et une protection de 65% contre *V. cholerae El Tor* (Ragot C., et al., 2006).

- Ces vaccins ont été étudiés en santé publique dans le but de protéger les populations exposées aux risques de flambées potentielles dans des pays ne pouvant garantir un approvisionnement en eau potable et un assainissement satisfaisant (Micronésie, 2000 : vaccin CVD 103HgR ; Mozambique, 2003-2004, Darfour, 2004, Indonésie (Aceh) 2005 : vaccin WC/rBS) (Aubry P, 2007).

En 2005, l'OMS et l'UNICEF ont publié une déclaration commune basée sur l'expérience du tsunami recommandant l'utilisation des vaccins anticholériques oraux pour limiter les risques de flambées de choléra dans les populations déplacées dans les zones d'endémie, de propagation et d'incidence du choléra au cours d'une flambée.

La prescription d'un vaccin anticholérique n'est pas recommandée en France pour les voyages touristiques. La vaccination peut être prescrite en cas de séjour de longue durée dans des zones endémiques ou épidémiques, zones d'hygiène précaire (camp de réfugiés, défaut d'alimentation en eau, contact avec des malades) (Aubry P, 2007).

Les recherches vaccinales contre le choléra, menées à l'Institut Pasteur dans l'Unité du Choléra et des Vibrions, dirigée par Jean-Michel Fournier, visent à mettre au point un vaccin chimiquement défini, utilisable par voie sous-cutanée. Cette équipe a tout d'abord démontré que des anticorps circulants, dirigés contre l'antigène majeur du vibron cholérique, étaient protecteurs : il s'agit de l'antigène O, un sucre porté par une grosse molécule ancrée dans la membrane du bacille (lipopolysaccharide ou LPS). Pour induire ces anticorps, l'équipe a couplé une partie du LPS comprenant l'antigène O à une protéine porteuse immunogène, l'anatoxine tétanique.

Ce vaccin "conjugué" a été testé avec succès chez la souris pour *Vibrio cholerae* sérotype O139 et devrait faire l'objet d'essais cliniques chez l'homme. Il reste à mettre au point des vaccins conjugués analogues pour les deux sérotypes - Ogawa et Inaba - de *Vibrio cholerae* O1. Pour cela, les chercheurs étudient par des méthodes très élaborées les structures antigéniques précises de ces deux sérotypes. Ils ont déjà réussi, en collaboration avec l'Unité de Biochimie Structurale de l'Institut Pasteur et avec une équipe américaine, à localiser très précisément, au moyen de la cristallographie, la partie de l'antigène O du sérotype Ogawa reconnue par un anticorps protecteur. Ils travaillent actuellement sur le sérotype Inaba. Ils ont par ailleurs montré par des études immunochimiques fines, en collaboration avec l'Unité de Chimie Organique, qu'il existe un déterminant antigénique commun aux deux sérotypes, lequel pourrait être inclus dans un vaccin. (Fournier J.M., 2006).

On espère, par cette voie de recherche très rationnelle, mettre au point un vaccin au pouvoir protecteur élevé, sans danger puisque chimiquement caractérisé, et donc utilisable à grande échelle pour protéger durablement les populations régulièrement menacées par le fléau cholérique (Fournier J.M., 2006).

## 12.2. Procédés de maîtrise

### 12.2.1. La chaleur

La résistance à la chaleur de *V. cholerae* est relativement faible, le D<sub>49°C</sub> et le D<sub>54°C</sub> (temps requis pour inactiver 90% de la population initiale aux températures indiquées) sont respectivement de 102 et 62,4 secondes (Bang et Drake, 2002).

Les *Vibrios parahemolyticus*, incluant les espèces entéropathogènes, sont rapidement détruits par la cuisson. Cependant la résistance à la chaleur dépend de plusieurs facteurs incluant la technique de chauffage et les conditions physiologiques. La pratique commerciale qui consiste à plonger les huîtres dans l'eau bouillante pour faciliter leur ouverture réduit le nombre de *V. parahaemolyticus* et les autres *Vibrio* à des niveaux indétectables selon (Hackney *et al.*, 1980, European Commission, 2001).

En milieu peptoné à 3% de NaCl, une diminution de 3 à 4 logarithmes décimaux est observée en cinq minutes à 55°C. A 60°C. La sensibilité à la chaleur augmente lorsque la concentration en NaCl est plus importante. Le chauffage atteignant une température interne de 65°C détruit *Vibrio parahaemolyticus*. Le chauffage des cellules de *V. parahaemolyticus* à 60°C, 80°C ou 100°C pendant une minute est létal pour une petite population (5×10<sup>2</sup> UFC/ml), cependant, certaines cellules survivent au chauffage à 60°C et même à 80°C pendant 15 minutes lorsque des populations de 2×10<sup>5</sup> cellules sont utilisées. Les cellules ne survivent pas à l'ébullition durant une minute (Twedt R.M., 1989).

D'autre part, la TDH étant thermorésistante, elle peut persister dans les produits de la mer cuits et provoquer la maladie suite à l'ingestion de ces denrées.

Le traitement thermique réduit la concentration en *V. parahaemolyticus* dans les coquillages. Cependant, *V. parahaemolyticus* est aussi associé à la consommation de produits de la mer cuits. Les conditions normales de cuisson pour plusieurs produits de la pêche peuvent ne pas tuer toutes les cellules de *Vibrio* et celles-ci peuvent se multiplier ensuite si le produit cuit n'est pas mangé immédiatement ou gardé à une température inférieure à 4°C ou supérieure à 60°C. Mais dans la majorité des cas, la présence de ces bactéries sur des produits cuits est liée à une recontamination. La transformation, la manipulation et les transports devraient être entrepris sous des conditions prévenant la recontamination et la croissance des *Vibrio*.

L'utilisation d'eau de mer contenant des *Vibrio* pathogènes présente un danger de recontamination des produits.

La contamination croisée des denrées cuites telles que les crabes et les crevettes doit être évitée par la stricte séparation des produits crus et cuits et en prévenant le transfert via les récipients et surfaces de travail ou par le personnel préparant à la fois des produits crus et cuits (Twedt R.M., 1989).

### **12.2.2. Le froid**

Gerichter *et al.* (1975) ont montré que *Vibrio cholerae* survit environ deux fois plus longtemps sous réfrigération que lorsqu'il est conservé à température ambiante. Felsenfeld, (1965) a observé que la bactérie peut survivre 14 jours dans des légumes conservés au réfrigérateur, 21 jours lorsqu'ils ont été cuits ou coupés. Ces durées sont comparables en ce qui concerne la viande de boeuf, elles seraient plus longues dans le poisson (Bonhomme A, 2003).

Le nombre de cellules de *V. parahaemolyticus* peut être réduit à basse température mais le micro-organisme n'est pas éliminé. Sa survie à différentes températures (4, 0, -18 et -24°C) a été déterminée et le temps nécessaire pour que le nombre total décroisse dépend du nombre initial de micro-organismes et de la température d'incubation. *V. parahaemolyticus* subit une chute initiale rapide du nombre de cellules viables lors d'une incubation sur des crevettes entières à 3, 7, 10 ou -18°C, mais des cellules survivant existent encore à la fin des huit jours. Ainsi, les quantités peuvent être réduites mais pas éliminées par réfrigération. Il a été également démontré que *V. parahaemolyticus* peut survivre dans les huîtres pendant au moins 3 semaines à 4°C et ensuite se multiplier après une incubation à 35°C pendant deux à trois jours. De façon similaire, les cellules de *V. parahaemolyticus* ont diminué en nombre dans du poisson cuit haché et du surimi à 5°C pendant 48 heures, mais la croissance reprend lorsque ces produits sont placés à 25°C. (Oliver et Kaper, 1997).

*V. parahaemolyticus* ne se multiplie pas dans les huîtres conservées à 10°C, par contre, la bactérie continue de se multiplier dans les huîtres après que celles-ci soient placées au réfrigérateur jusqu'à ce que la température des tissus du coquillage soit inférieure à 10°C. Ce délai pour que les huîtres se refroidissent varie selon l'efficacité du milieu de refroidissement, de la quantité d'huîtres à réfrigérer et de leur rangement dans la chambre froide. Des études réalisées aux Etats-Unis par DePaola (1999) ont établi que sur une seule huître à 30°C encore dans sa coquille et dans laquelle une sonde thermique a été placée, le taux de refroidissement

approximatif observé était de 0,5°C par minute lorsqu'elle était placée dans un réfrigérateur à 3°C. Cependant, pour 24 huîtres la durée requise pour passer de 26°C à 3°C a été de 7 heures (FAO/WHO, 2001).

D'après le United States National Shellfish Sanitation Program (NSSP), le temps de réfrigération nécessaire pour obtenir une diminution de dix fois du nombre de *Vibrio parahaemolyticus* est de 20 heures (FAO/WHO, 2001).

Le taux de croissance de *V. parahaemolyticus* va ensuite diminuer lorsque la température des produits de la mer va devenir plus basse. Au début de la réfrigération, lorsque les huîtres viennent d'être placées au froid, le taux de croissance est toujours égal à celui initialement observé à température ambiante. A la fin de la période de réfrigération, lorsque les huîtres ont atteint la température du lieu de stockage, il n'y a plus de croissance du micro-organisme et leur nombre va diminuer lentement ensuite. (Gooch *et al.* 1999) ont montré que dans les huîtres, le nombre de *Vibrio parahaemolyticus* diminue de 0,003 log<sub>10</sub> par heure lorsqu'elles sont conservées à 3°C pendant 14 à 17 jours. Cependant, dans le commerce, les températures de conservation des huîtres sont plus souvent situées entre 5°C et 10°C (Bonhomme A, 2003). La réfrigération des coquillages, et plus spécifiquement avant purification, n'est pas une pratique très largement répandue en Europe. Le transport des fruits de mer devrait être réalisé sous réfrigération. Etant donné que les concentrations en *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer venant d'être récoltés sont généralement faibles, et que la multiplication n'intervient pas en dessous de 10°C, un refroidissement rapide et le contrôle de la température permet de diminuer au maximum l'incidence des maladies chez l'homme dans les régions endémiques.

### **12.2.3. Purification**

La purification microbienne est un procédé au moyen duquel les coquillages sont capables de se décontaminer soit dans leur milieu naturel ou des lieux spécifiques (bassins de purification). Les espèces de coquillages communément purifiées en Europe sont les moules (*Mytilus edulis*), les huîtres plates (*Ostrea edulis*), et les huîtres portugaises (*Crassostrea angulata*). D'autres espèces purifiées en France, en Espagne et au Portugal incluent les palourdes (*Venerupis pullastra*), les praires (*Venus verrucosa*), les clovisses (*Venerupis geographicus*, *V. aurea*), et les lavignons (*Scobricularia plana*). Aux Etats-Unis les espèces les plus souvent soumises à la purification sont les palourdes (*Mya arenaria* et *Mercenaria mercenaria*) (Lee et Younger, 2002).

Une étude réalisée par Kelly et Dinuzzo, (1985) s'est intéressée à la capacité des huîtres lors de la purification à la bioaccumulation et à l'élimination de *Vibrio vulnificus*. Selon ces auteurs, ce micro-organisme s'élimine lentement dans les huîtres, il faut 16 jours pour qu'il disparaisse totalement. Cette découverte suggère que *V. vulnificus* est présent dans les huîtres du fait de son accumulation durant le processus de filtration naturel ainsi que par sa multiplication dans les huîtres. Les espèces de *Vibrio* persistent durant la purification des huîtres.

En plaçant les huîtres dans une eau ayant une salinité supérieure à celle où elles ont été récoltées les huîtres, on peut diminuer le nombre de *V. vulnificus* dans ces mollusques. Une diminution significative intervient après 7 jours mais pour certains bassins une durée de 1 mois ou plus est nécessaire pour réduire le nombre à moins de 10 cellules par gramme. Une autre étude a montré qu'en plaçant les huîtres dans une eau présentant une forte salinité (> 3,2%) une diminution du nombre de cellules de *Vibrio vulnificus* (<10 par gramme) a été obtenue en deux semaines (FAO/WHO, 2001).

Il est souvent supposé que les coquillages ayant subi une purification sont salubres, cependant, des bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont été associées à des flambées de gastro-entérites après consommation d'huîtres purifiées. Plusieurs auteurs ont montré que la purification des coquillages n'est pas un moyen permettant l'élimination des *Vibrio* dans les coquillages (Lee et Younger, 2002).

#### **12.2.4. Irradiation**

En général, les espèces du genre *Vibrio* sont sensibles à l'ionisation et une dose de 1kGy s'est montrée être létale pour *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*.

D'après Radish *et al.* des doses de 3 kGy sont nécessaires pour éliminer les *Vibrio* dans les crevettes congelées. Le Comité Scientifique de l'Alimentation (Scientific Committee on Food, SCF) s'est exprimé sur l'ionisation de huit denrées le 17 septembre 1998, dont les crevettes. La plupart des pays européens ont une production insuffisante de crevettes décortiquées et surgelées. C'est pourquoi, afin de satisfaire la demande du marché, beaucoup sont importées essentiellement depuis l'Asie du sud. Etant données les conditions actuelles de récolte, préparation, conservation et exportation dans les pays d'origine, ces produits importés ne présentent pas toujours les niveaux microbiologiques autorisés dans les pays européens. Le comité précise qu'une irradiation à une dose de 5 kGy s'est montrée efficace et sans danger toxicologique ou nutritionnel (European Commission, 2001).

### 12.2.5. Conditionnement sous vide

Ce procédé semble efficace pour réduire le nombre de *Vibrio vulnificus* trouvé dans les produits de la mer d'après Parker *et al.*, (1994). Mais tout comme la réfrigération, le conditionnement sous vide ne peut être considéré comme une mesure éliminant complètement *V. vulnificus* dans les produits de la mer (European Commission, 2001).

### 12.2.6. Les désinfectants

Les *Vibrio* sont sensibles à de nombreux désinfectants : hypochlorite de sodium, éthanol, glutaraldéhyde, formaldéhyde. Des agents chimiques inhibiteurs de croissance sont souvent utilisés pour la conservation. Les polyphosphates inhibent la croissance des *Vibrio*, mais leur activité varie selon l'espèce et le type de phosphate.

L'effet bactéricide de l'acidité varie aussi selon l'espèce de *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* pouvant croître à un pH de 4,8 (Bonhomme A, 2003).

La sensibilité de *Vibrio cholerae* aux désinfectants a été étudiée et utilisée dans l'industrie alimentaire. De toutes les substances testées, l'acide peracétique était la plus efficace et l'hypochlorite (eau de Javel), sans doute le désinfectant le plus largement utilisé, était aussi efficace à condition que des protéines ne soient pas présentes. Les composés d'ammonium quaternaire sont assez efficaces à 50 ppm mais les substances amphotères nécessitent des concentrations supérieures à 50 ppm dans des conditions similaires.

L'isopropanol est utilisé pour la désinfection des mains et se révèle très efficace pour tuer *Vibrio cholerae* lorsqu'il est utilisé à une concentration de 20%, ce qui n'est pas le cas de la chlorhexidine (ICMSF, 1996).

Les souches de *Vibrio parahaemolyticus* peuvent adhérer à des surfaces abiotiques durant la préparation des aliments. Une étude réalisée par Wong *et al.* (2002) a observé cet attachement, la formation du biofilm et l'inactivation du pathogène sur de l'acier inoxydable et du verre. Cet attachement a été réduit pour les cultures de bactéries soumises à divers stress tels qu'une température basse (4°C), un choc thermique à 42°C ou deux phases d'adaptation à pH acides de 5,8 et 5,0. Les souches cliniques s'attachaient mieux que les souches environnementales sur les surfaces en acier inoxydable et diminuent ensuite. L'attachement cellulaire sur les surfaces en acier inoxydable est rapidement inactivé par l'eau distillée, l'hypochlorite de sodium ou l'acide propionique (Bonhomme A, 2003).

## **13. Epidémiologie**

### **13.1. Réservoirs**

L'homme et les animaux représentent les réservoirs les plus importants pour la contamination par les *Vibrio*.

#### **13.1.1. L'homme**

L'homme colonisé par les *Vibrio* sert à la fois de milieu de culture et de moyen de transport pour le *Vibrio* cholérique, permettant ainsi à ce dernier de disséminer dans le monde entier, même dans les régions où il n'existe vraisemblablement pas de réservoir environnemental (Fournier et Quilici, 2002).

Les *Vibrio* responsables du choléra peuvent persister dans des foyers endémiques en Asie et plus particulièrement en Inde, réapparaissant pour causer des épidémies locales qui se répandent ensuite à d'autres pays du monde favorisées par le mouvement des personnes infectées.

Au Japon, la plupart des cas d'intoxications à *Vibrio parahaemolyticus* a lieu entre Juin et Octobre, la bactérie peut être isolée des selles d'individus asymptomatiques (0,3% des La durée de ce portage n'est jamais longue, l'organisme persiste de 3 à 7 jours dans les selles de sujets sains et de 10 à 16 jours chez les individus ayant soufferts de gastro-entérite (Twedt R.M, 1989).

#### **13.1.2. Les animaux**

Les espèces du genre *Vibrio* sont très courantes à la surface et dans le contenu intestinal des animaux marins (Holt et al ., 1994).

*Vibrio cholerae* et *V.parahaemolyticus* sont capables de produire une chitinase si bien que le nombre de ces *Vibrio* augmente lorsque les organismes marins présentant de la chitine sont plus nombreux en particulier lorsque la température est plus importante. Les copépodes seraient des porteurs potentiels de bactéries pathogènes telles que *Vibrio cholerae*, la chitine étant le principal composant de la carapace du copépode. *Vibrio cholerae* et d'autres espèces de *Vibrio* sont responsables en grande partie de la décomposition et du recyclage de la chitine dans la mer. Récemment, *Vibrio cholerae* a été mis en évidence dans d'autres organismes aquatiques, telles que les cyanobactéries, les diatomées, les phaeophytes et les plantes aquatiques d'eau douce qui abriteraient donc cette bactérie. L'adhérence de *Vibrio cholerae* à

la surface des copépodes vivants contribuerait significativement à sa survie et à sa distribution dans les environnements aquatiques.

*Vibrio cholerae* O1 peut être isolé depuis divers crustacés incluant les crevettes et les crabes. La capacité de *Vibrio cholerae* à s'attacher à la carapace chitineuse des crustacés a été étudiée (Castro-Rosas et Escartin, 2002). Cet attachement était plus important sur les crabes que sur les crevettes. Une fois que les cellules de *Vibrio* ont atteint la carapace, elles s'y attachent grâce à des interactions ioniques et des adhésines. Cette caractéristique assure à la bactérie sa persistance dans le milieu marin et peut favoriser sa transmission aux humains. Cet attachement est influencé par des facteurs environnementaux tels que la salinité, le pH et la température. L'adhérence optimale a été observée pour une concentration en NaCl de 1,0 à 1,5% et de telles concentrations sont courantes dans les eaux des estuaires.

L'attachement aux carapaces de crevettes était maximal pour des pH situés autour de 6 et 7 et il était très nettement réduit lorsque la température diminuait. Les niveaux de moins de 2% d'attachement étaient observés à 3°C, tandis que ceux-ci étaient supérieurs à 20 % à 37°C. De plus, cette étude a mis en évidence une multiplication de *V. cholerae* O1 sur les crevettes et la face dorsale des crabes conservés à 22°C pendant 24 heures, ce qui montre que l'organisme non seulement est capable de s'attacher mais colonise également les organismes marins.

Cette étude a montré que *V. cholerae* était capable de former des colonies rugueuses sur les organismes sur lesquels il se multiplie. Ce phénotype est considéré comme une phase de survie qui protège la bactérie grâce à un exo-polysaccharide. Cette capacité de former des biofilms a des implications écologiques et épidémiologiques car sous ces conditions, l'organisme est plus résistant aux stress physiologiques. Ainsi, *V. cholerae* O1 est protégé contre les effets des faibles températures lui permettant de coloniser les particules de chitine (Castro-Rosas et Escartin, 2002).

Le nombre de *Vibrio cholerae* en suspension dans l'eau est généralement faible, approximativement 10 unités formant colonies par litre pour les sérotypes non-O1 et moins de 50 UFC/litre pour les souches O1. Cependant l'organisme pouvant se multiplier rapidement, les copépodes peuvent contenir  $10^5$  bactéries attachées à leur surface. Cependant, la surface, les branchies ou les intestins des crevettes ne constituent pas l'habitat des *V. cholerae* O1 et O139 impliqués dans les épidémies de choléra. En fait, il existe un très faible nombre de rapports décrivant l'isolement de *V. cholerae* O1 et O139 dans les produits de la mer.

*Vibrio parahaemolyticus* est souvent associé aux organismes présentant un exosquelette constitué de chitine tels que les crevettes, les crabes mais il est aussi très fréquemment isolé des mollusques marins et de poissons. Les niveaux de prévalence naturelle dans les poissons et fruits de mer est généralement faible (en dessous de  $10^3$  par gramme) excepté dans les eaux habituellement chaudes dans lesquelles la densité de cette bactérie peut alors atteindre  $10^6$  par gramme (ICMSF, 1996). Les souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de l'eau de mer et des animaux marins sont de façon prédominante négative au test de Kanagawa, suggérant que la majorité n'est pas pathogène.

Dans une étude réalisée par Gjerde et Bøe, (1981) sur un total de 200 prélèvements de moules, d'eau de mer, de sédiments et de poissons collectés dans les eaux norvégiennes, *Vibrio parahaemolyticus* n'a été détecté qu'en juillet et août. Dans cette étude, 10% des échantillons de moules contenaient *V. parahaemolyticus* et 4% des prélèvements de sédiments. Dans tous les cas où la bactérie était détectée, l'eau de mer présentait une température de 15°C ou plus. Durant la saison froide, *V. parahaemolyticus* n'a été détecté dans aucun échantillon. Durant l'été, les coquillages ont souvent des quantités de *Vibrio parahaemolyticus* de 10 à 100 fois plus élevées que dans l'eau de mer.

*V. parahaemolyticus* a été détecté dans l'eau et les produits de la mer collectés dans la baie d'Arcachon (côte Atlantique) dans le sud-ouest de la France.

Macian et al., (2000) a rapporté dans une étude sur l'identification des *Vibrio* dans des prélèvements d'eau de mer et de coquillages de la côte méditerranéenne d'Espagne que parmi les 284 souches isolées, 14 (5%) étaient des souches de *V. parahaemolyticus*.

*Vibrio vulnificus* est surtout isolé dans les huîtres dont le mode de nutrition par filtration contribue à concentrer la bactérie. Même lorsque *V. vulnificus* est isolé en faibles quantités dans l'eau de mer (7 unités formant colonies par ml), la bactérie est présente en plus grande quantité dans les huîtres ( $6 \times 10^4$  UFC/g) (Oliver J.D., 1989). *Vibrio vulnificus* est trouvé dans différents tissus de l'huître et peut vivre dans les hémocytes. Chaque huître peut libérer jusqu'à un million de cellules de *V. vulnificus* par jour dans l'eau, démontrant ainsi sa capacité de multiplication dans l'huître. La bactérie a également été isolée de crabes, palourdes, poissons et plancton.

Une saisonnalité marquée a été observée puisque *Vibrio vulnificus* a été isolé de 72,6% des prélèvements effectués en été et de 6, 51,8% et 3,0 % de ceux réalisés en printemps, automne et hiver respectivement (cf. tableau 10).

**Tableau 10**

Prévalence de plusieurs espèces de *Vibrio* dans différents prélèvements durant une étude sur des élevages de crevettes en Inde (Bhaskar et al., 1998).

Espèces de <i>Vibrio</i>	Durant l'élevage sédiment	Eau	Crevettes	Chair de Palourde	Aliment Elaboré	Durant la récolte sédiment	Eau	Crevettes
<i>V.parahaemolyticus</i> K+	1 (1,6)	2 (3,5)	1 (1,9)	3 (7,9)	ND	ND	1 (6,7)	ND
<i>V. parahaemolyticus</i> K-	21 (33,8)	14	13	15 (39,5)	2 (20,0)	4 (15,4)	3	3 (17,7)
<i>V. alginolyticus</i>	24 (38,7)	15	29 (26,3)	10 (26,3) (56,9)	ND	18 (69,2) (33,3)	5	8 (47,0)
<i>V. cholerae</i>	12 (19,3)	12	2 (3,9)	1 (2,6)	6 (60,0)	1 (3,9)	3	2 (11,8)
<i>V. vulnificus</i>	4 (6,6)	14(26,6)	6 (11,8)	7 (18,5)	2 (20,0)	3 (11,5)	3(20,0)	4 (23,5)
<i>V. mimicus</i>	ND	ND	ND	2 (5,2)	ND	ND	ND	ND
<b>Total de V. spp.</b>	62	57	51	38	10	26	15	17

Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de prévalence de chaque espèce

ND : Non Détectés

### 13.2. Prévalence dans les aliments

La plupart des études cherchant à déterminer la présence de *V. cholerae* O1 et O139 dans l'eau ou les aliments a été menée en utilisant des techniques d'enrichissement préalables.

Il existe très peu de données concernant l'isolement de *V. cholerae* O1 et O139 dans les produits de la mer. Les études effectuées dans le sud-est de l'Asie indiquent dans la plupart que *V. cholerae* O1 et O139 est absent des élevages de crevettes, dans une autre étude réalisée en Inde, *V. cholerae* O1 a été détecté dans 0,2% des crevettes crues (FAO/WHO, 2001).

La prévalence de *V. parahaemolyticus* dans les produits de la mer frais vendus à Mexico était de 45,6%, soit 71,4 % dans les poissons, 44% dans les huîtres et 27,6% dans les crevettes (Torres-Vitela et Fernandez-Escartin, 1993)

En 1997, le sérovar O3 :K6 de *V. parahaemolyticus* a causé une rapide augmentation des toxi-infections alimentaires à Taïwan (environ 80% des toxi-infections alimentaires à *V. parahaemolyticus*). D'après des études génétiques utilisant l'électrophorèse en champ pulsé PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), ces souches O3 :K6 étaient génétiquement identiques ou très proches des souches initialement isolées en Inde en 1996 et ensuite

disséminées à d'autres pays d'Asie. Ce fait suggère que les touristes et les produits de la mer importés peuvent constituer un véhicule important pour ces pathogènes.

Une étude réalisée par la Food and Drug Administration (FDA) a examiné des échantillons de produits de la mer, 86% étaient positifs à *Vibrio parahaemolyticus*. Des densités de 1300 UFC (Unité Formant Colonie)/g d'huître et de 1000 UFC/g de chair de crabe ont été observées mais les niveaux les plus typiques étaient de 10 UFC/g. (Oliver et Kaper, 1997).

En Italie, la concentration de *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer est usuellement en dessous de  $10^3$  UFC/g, mais elle peut augmenter lorsque les produits sont collectés dans de l'eau plus chaude. Une étude réalisée sur les produits de la mer Adriatique a montré la présence de *V. parahaemolyticus* dans 1,6% des prélèvements (Ripabelli et al., 1999).

Dans une étude dirigée par l'unité de contrôle des moules de l'Institut Agricole de l'université de Santiago de Compostela en Espagne, 99 prélèvements de moules de la côte nord-ouest ont été étudiés. *V. parahaemolyticus* a été isolé depuis 8% des échantillons selon la méthode d'isolement ISO 8914 :1990 (European Commission, 2001).

Une étude réalisée par Davies et al., (2001) sur du poisson frais de France, Grande-Bretagne, Grèce et Portugal s'est intéressée à la présence de différents pathogènes pour l'homme dont *Vibrio parahaemolyticus*. Les poissons ont été prélevés dans les lieux de vente et ont été transportés au laboratoire sur de la glace. *Vibrio parahaemolyticus* a été détecté dans les prélèvements effectués au Portugal (35%) et en Grèce (14%) mais pas en Grande-Bretagne ni en France.

En Angleterre, au Pays de Galles et en Ecosse, la prévalence des *Vibrio* dans les produits de la mer a été étudiée dans des coquillages récoltés et des coquillages cuits et prêts à être consommés durant les années 1975- 1976. Ayres et Barrow ont détecté *V. parahaemolyticus* dans 14% des coquillages lors de leur récolte avec une fréquence plus importante durant l'été (European Commission, 2001).

D'après le système d'alerte rapide européen, *V. parahaemolyticus* a depuis 1995 été notifié 61 fois dans des produits de la mer importés en Europe depuis le Bangladesh, Belize, le Canada,

la Chine, l'Equateur, l'Inde, l'Indonésie, la Côte d'Ivoire, la Malaisie, le Mozambique, la Namibie, les Pays-Bas, le Nigéria, le Sénégal, l'Espagne, le Sri Lanka, la Tanzanie, la Thaïlande, la Turquie et le Viet Nam (European Commission, 2001) (cf. tableau 11, tableau 12).

*Vibrio parahemolyticus* se trouve à une fréquence assez élevée dans les moules dans tout les pays du monde et les facteurs pouvant influencer le nombre de *V. parahemolyticus* dans les fruits de mer lors de leur consommation incluent :

- La température de l'air ambiant lors de leur récolte
- Le délai entre la récolte et la réfrigération
- Le temps nécessaire pour que les produits se refroidissent une fois placés sous réfrigération
- La durée de la conservation au froid jusqu'à la consommation (FAO/WHO, 2001).

Des études concernant la quantité de *Vibrio parahemolyticus* dans les maquereaux et les palourdes a montré que les coquillages étaient beaucoup plus contaminés (environ deux logarithmes décimaux) que les maquereaux et l'eau de mer. Il existe peu de données concernant le risque potentiel de contamination des poissons lorsqu'ils sont à bord des navires de pêche.

**Tableau 11**

Incidence de *Vibrio parahaemolyticus* dans les aliments importés à Taiwan (Bonhomme A, 2003).

Pays d'origine	Denrée	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons Positifs	Incidence (%)
Vietnam	Crabe	126	41	32,5
	Homard	59	26	44,1
	Poisson	95	20	21,1
	Escargo	106	47	44,3
Hong Kong	Crabe	114	81	71,1
Thaïlande	Crabe	32	26	81,3
	Crevette	62	47	75,8
Indonésie	Poisson	92	27	29,5
<b>Total</b>		686	315	45,5

**Tableau 12**

Nombre et prévalence de *Vibrio parahaemolyticus* dans les huîtres, les sédiments et l'eau  
(FAO/WHO, 2001).

Lieu	Saison	Prélèvements	Nombre de <i>V. Parahaemolyticus</i>	Prévalence	Conditions Environnementales
Colombie Britannique (Canada)	Juillet-août	Huîtres de culture et sauvages	-	21% et 44%	Eaux estuariennes
	Mars-avril	Huîtres de culture et sauvages	70 UFC/ml	nd	
	Eté	Eau estuarienne		11-33% des échantillons d'eau	Eau chaude
Baie de Willapa et Washington (Etats-Unis)	Août	Eau Sédiments Huîtres	0,5-3,0 MPN/g 1,6-5,4 MPN/g 1,5-4,0 MPN/g	-	Salinité 23,6-30,5 ppt température 15,5-22,6°C
Long Island (Etats-Unis)	Octobre à Juin	Huîtres	3,6-23 MPN/g	33%	-
Ile du Prince Edouard	Toute l'année	Huîtres Moules	-	6,7% 4,7%	-
Hong Kong	Juin à octobre	Huîtres (récolte)	$3,4 \times 10^4/g$	-	-
		Moules (marché)	$4,6 \cdot 10^4/g$		
		Palourdes (marché)	$6,5 \cdot 10^3/g$		
Japon	-	Eau	-	+	
		Sédiment		+	
		Huîtres (marché)		2/8	-
Baie d'Hiroshima (Japon)	Juillet 1987 à Juin 1988	Huîtres	10-10 <sup>3</sup> /100g	69% (mai à octobre)	Température comprise entre 19,3°C et 22,0°C

### 13.3. Fréquence des infections et intoxications à *Vibrio dans le monde*

#### 13.3.1. *Vibrio cholerae* O1 et O139

Le choléra connaît une réémergence en tant que maladie infectieuse avec une augmentation de son incidence globale. En 1994, les cas de choléra ont été notifiés dans 94 pays, ce qui a constitué le plus grand nombre connu jusqu'alors de pays touchés en une année (OMS, 1995). Le nombre des cas de choléra signalés à l'OMS en 2005 a sensiblement augmenté. Cinquante deux pays ont déclaré au total 131 943 cas, dont 2272 décès. Cela représente une hausse globale de 30% par rapport au nombre des cas déclarés en 2004.

Par contre le nombre global des décès a baissé de 2345 à 2272, ramenant le taux de létalité général à 1,72%, contre 2,3% l'année précédente (OMS, 2006) (cf. tableau 13)

**Tableau 13**

Cas de choléra et décès notifiés à l'OMS, 2005 (OMS, 2006).

Région	Nombre total de cas, incluant cas importés et décès	Cas importés	Décès	TL (%)
<b>Asie</b>				
Afghanistan	33		0	0
Chine	98		4	0.41
Inde	3 155		6	0.19
Indonésie	1 338 1	4	19	1.42
Iran (République islamique d')	1133		11	0.97
Japon	43	33	0	0
Liban	1			0
Philippines	139	1	2	1.44
Qatar	2	2		0
<b>Total</b>	<b>6824</b>	<b>40</b>	<b>42</b>	<b>0.62</b>

TL : Taux de Létalité

En Afrique depuis 1970, *Vibrio cholerae* O1 *El Tor* s'est progressivement répandu dans la plupart du continent avec des taux de létalité situés autour de 4% et 12%. De 1991 à 1996, le nombre de cas est resté élevé et situé autour de 70000 à 160000 (OMS, 1997).

L'introduction de *vibrion cholera* en Algérie a été en 1834 à Oran où le nombre de décès à été de 500 allant jusqu'à 1500 morts à Mascara et Mostaganem.

En 1835 le nombre de décès est arrivé à 2576 morts à Alger surtout dans le quartier israélite où le nombre de décès est arrivé jusqu'à 100 morts par jour.

En 1849 à Oran ,1817 décès sont déclarés à l'hôpital civil Saint Lazare d'Oran.

En 1854 à Oran le bilan global s'établit à 600 malades dont 295 militaires et 300 décès dont 135 militaires. Cette épidémie fera en cette même année dans la ville de Constantine et des villages environnants, 1821 morts sur une population de 6200 habitants.

En février 1855, le bilan pour le département d'Oran dont la population était estimée alors à 70 000 personnes était de 1983 cas avec 770 décès. Cette épidémie, qui a duré 4 mois, a été considérée comme beaucoup moins étendue et moins grave que celles des années précédentes.

En cette même date l'épidémie qui aura duré 3 mois à Alger et demi a entraîné 579 décès civils sur 1133 cas (51 %) (Abid. L, 2006).

Le 11 juillet 1867 à Batna, on a appris qu'une épidémie de « choléra asiatique » mélangé à des cas de fièvre pernicieuse sévissait chez les Ouled Amor (Tribu du Hodna). Cette épidémie entraîna les 19, 20 et 21 juillet 85 décès. Par la suite c'est à Biskra que l'épidémie se déclara avec plus de 65 décès au cours de ce moi de juillet (Abid. L, 2006).

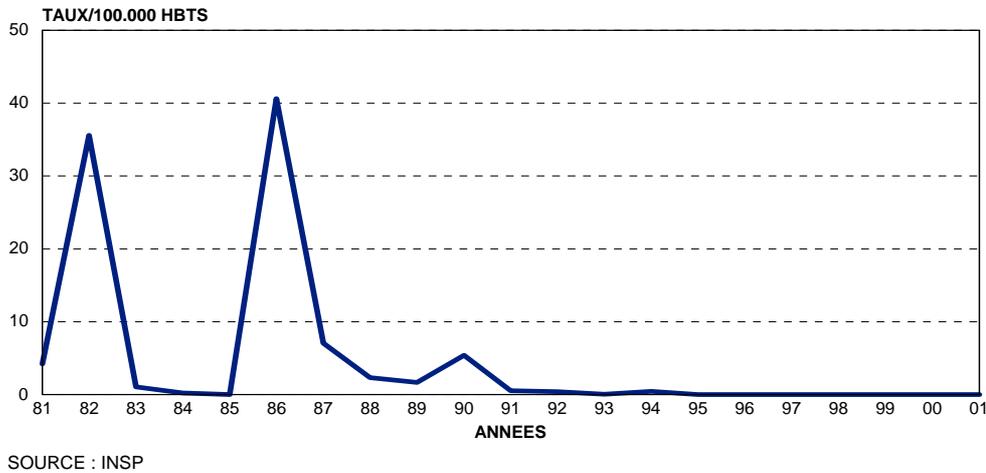
En 1971, réapparition de la maladie du cholera avec une poussées épidémiques tous les 4 ans. Le nombre de cas est de 1332 cas et 110 décès.

Une importance épidémie en 1986 avec 9000 cas, la dernière épidémie enregistrée est en 1991, bien que au court de l'année 2001, un cas isolé de *choléra* a été notifié par la wilaya de Mila chez un homme âgé de 67 ans. Le diagnostic a été confirmé par le laboratoire de l'institut Pasteur d'Algérie. L'origine de la contamination n'a pas été précisée (I.N.S.P, 2001).

Depuis l'année 2001, aucun cas de *Vibrio cholera* n'a été déclaré.

La figure 17 montre l'incidence du cholera en Algérie (Année 1981-2001).

**INCIDENCE DU CHOLERA**  
**ANNEES 1981 - 2001**



**Figure 3** : Incidence du cholera en Algérie (I.N.S.P, 2001).

### 13.3.2. *Vibrio parahaemolyticus*

Au Japon et dans l'est de l'Asie, *Vibrio parahaemolyticus* est une cause très courante de maladie alimentaire et constitue plus de 70% de cas d'infections alimentaires dans les années 60, 1679 cas ont été recensés entre 1968 et 1972.

En 1994-1995, 1280 cas ont été enregistrés et durant cette période, les intoxications alimentaires dues à *Vibrio parahaemolyticus* ont dépassé en nombre celles du à *Salmonella*. Au Japon, le rapport annuel des institutions de santé publique et les centres de santé concernant l'isolement de *V.parahaemolyticus* de sources humaines ont tendance à augmenter depuis 1997, 496 flambées ont été enregistrées durant les trois années de la période 1996-1998 (102 en 1996, 160 en 1997 et 234 en 1998) (OMS, 1999). Aujourd'hui *V. parahaemolyticus* est responsable de 50% à 70% des cas de maladies liées à la consommation de produits de la mer au Japon. En moyenne 500 à 800 infections à *V. parahaemolyticus* concernent environ 10000 personnes chaque année. L'augmentation de l'incidence est attribuée au sérovar O3 :K6.

A Taïwan, entre 1986 et 1995, 197 flambées d'intoxications alimentaires ont été causées par *Vibrio parahaemolyticus* et plus de 200 flambées ont été notifiées en 1997, 146 cas (European Commission, 2001).

Dans la plupart des pays hors d'Asie, l'incidence des infections à *Vibrio parahaemolyticus* est faible (de 0,5 à 3%) ceci reflétant peut-être un mode différent de consommation des fruits de mer.

Aucun cas de *Vibrio parahaemolyticus* n'a été enregistré en Algérie en raison de l'absence de systèmes de surveillance.

Aux Etats-Unis, la première flambée majeure d'infection à *Vibrio parahaemolyticus* est survenue dans l'état du Maryland en 1971 et a été reliée à la consommation de crabes non correctement cuits à la vapeur. Les épidémies suivantes sont intervenues dans les zones côtières des Etats-Unis. Parmi les 42 flambées survenant entre 1973 et 1987, 33 impliquaient des coquillages. La plus importante d'entre elles est intervenue en été de l'année 1978 et a concerné 1133 personnes parmi les 1700 qui participaient à un dîner. La denrée concernée était des crevettes cuites. Elles avaient été bouillies le matin mais avaient été refroidies dans les boîtes dans lesquelles elles avaient été pêchées. Les crevettes encore chaudes avaient ensuite été transportées dans un camion non réfrigéré jusqu'au site du dîner et tenues encore 7 à 8 heures avant d'être servies le soir (European Commission, 2001).

Une étude réalisée sur 15 ans par un hôpital situé près de la baie de Chesapeake a montré que plus de 69% des 13 prélèvements de selles contenant des vibrions *V. parahaemolyticus* comme était le seul pathogène. De même *V. parahaemolyticus* a été le *Vibrio* le plus souvent isolé (35 cas) des prélèvements de selles effectués pour 51 personnes présentes à une conférence à la Nouvelle-Orléans et souffrant de diarrhée (European commission, 2001).

Trois flambées d'infections à *V. parahaemolyticus* liées à la consommation d'huîtres crues sont survenues en 1997 et 1998 aux USA. La première a eu lieu en juillet et août 1997 et a entraîné 209 cas confirmés par culture chez des personnes qui avaient consommé des huîtres récoltées depuis les côtes de Californie, Oregon, Washington et Colombie britannique (CDC, 1998). Durant l'été 1998, 416 personnes ont développé une diarrhée après avoir consommé des huîtres de la baie de Galveston au Texas et *Vibrio parahaemolyticus* a été confirmé pour 110 cas. Entre juillet et septembre 1998, 23 cas confirmés par culture de *V. parahaemolyticus* ont été identifiés chez des habitants du Connecticut, du New Jersey et de New York qui avaient consommé des huîtres et des palourdes issues du détroit de Long Island (CDC, 1999).

**Tableau 14**

Toxi-infections alimentaires associées à *Vibrio parahaemolyticus* aux Etats-Unis (Bonhomme A, 2003).

Nombre de personnes Malades	Lieu	Année	Denrée impliquée
40 flambées	Maryland	1971	Crabes cuits à la vapeur 40 flambées 15 Etats 1973-1998 Produits de la mer ou contamination croisée entre produits de la mer crus et cuits
209 personnes	Etats-Unis	1997	Huîtres de Californie, Orégon, Washington et Colombie Britannique
6 cas confirmés par culture	Amérique du Nord	1981	-
416	Texas	1998	Huîtres crues pêchées dans la baie de Galveston (USA)
23 cas confirmés par culture	Etats-Unis	1998 (de mai à décembre avec un pic en juillet-août)	Produits de la mer crus

**Tableau 15**

Incidence des infections humaines à *Vibrio parahaemolyticus* en Europe  
(European Commission, 2001).

Pays	Période considérée	Nombre de cas	Symptômes
Danemark	1987-1992	<b>13</b> <b>10</b>	Infection d'une plaie Otite
Angleterre et Pays de Galles	1980-2000 1995-1999	<b>2</b> <b>115</b>	Gastro-entérite
France	1995-1998  1997	<b>6</b> <b>1</b> <b>44</b>	Gastro-entérite Septicémie Gastro-entérite*
Irlande du nord	1990-1999	<b>0</b>	
Ecosse	1994-1999	<b>6</b>	
Espagne	1995-1998	<b>19</b>	Gastro-entérite
Suède	1992-1997	<b>350</b>	Gastro-entérite**
Norvège	1999	<b>4</b>	

\*Toxi-infection alimentaire collective associée à des produits de la mer importés d'Asie.

\*\* Toxi-infection alimentaire collective associée à des langoustines importées de Chine.

### 13.3.3. *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139

En France, entre 1995 et 2000, vingt souches de *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139, isolées chez l'homme ont été adressées au Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra. Les formes cliniques ont été très variées (gastro-entérite, septicémie et infection des tissus mous, infection cutanée et otite) ainsi que les sources possibles de contamination.

L'incidence des infections à vibrions non cholériques est difficile à apprécier, en particulier pour les formes les moins sévères. En effet, le diagnostic étiologique n'est pas connu pour de nombreuses gastro-entérites, vraisemblablement liées, pour une part, à ces vibrions. De plus, l'isolement de ces organismes dans les selles nécessite l'emploi d'un milieu de culture sélectif (milieu thiosulfate, citrate, sels biliaires, saccharose (TCBS) qui n'est pas utilisé en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique. Les cas de gastro-entérites liés à ces vibrions étant probablement sous-diagnostiqués, la fréquence de ces infections est donc sous-estimée, contrairement à ce qui se passe pour les infections extra intestinales dans lesquelles l'isolement de vibrions dans le sang, ou dans un autre milieu biologique habituellement stérile, est plus aisé (Fournier et Quilici, 2002).

Dans une étude réalisée à Jakarta en Indonésie chez des patients hospitalisés et présentant une diarrhée, les bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées de 21% des 4820 patients entre 1996 et 1998. *Vibrio cholerae* O1 (49,5%) et *Vibrio parahaemolyticus* (30,1%) constituaient les deux principales espèces isolées, suivies par *Vibrio cholerae* non-O1 (16,9%) et *V. fluvialis* (9,4%). Un faible nombre de *V. furnissii* (0,08%), *V. metschnikovii* (0,06%), *V. mimicus* (0,08%) et *V. hollisae* (0,06%), soit comme seul isolat ou avec d'autres espèces de *Vibrio* ont été également isolés. Pour 19,4% des patients, les bactéries isolées appartenaient au seul genre *Vibrio* (Lesmana et al., 2002), (cf. tableau 16, 17)

**Tableau 16**

Cas d'infections à vibrions non cholériques identifiés entre 1995 et 2000 par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra (Geneste et al., 2000).

Espèces	Nombre de cas selon les syndromes (%) Gastro-entérites	Septicémies, infections des tissus mous	Infections cutanées	Otites	Total
<i>V. cholerae</i>	12 cas 3 (25)	23 cas 12 (52)	6 cas 2 (33)	11 cas 3 (27)	52 cas 20 (38)
<i>V. parahaemolyticus</i>	9 (75)	1 (4)	0	0	10 (19)
<i>V. vulnificus</i>	0	6 (26)	1 (17)	0	7 (14)
<i>V. alginolyticus</i>	0	2 (9)	3 (50)	8 (73)	13 (25)
<i>V. hollisae</i>	0	2 (9)	0	0	2 (4)

**Tableau 17**

Distribution des espèces de vibrions en fonction des syndromes en France en 1999- 2001 (Bonhomme A, 2003).

Nombre de cas selon les syndromes							
Espèces de Vibrions	Gastro entérite Isolée	Gastro-entérite + Septicémie	Septicémie Isolée	Septicémie +cellulite gangréneuse d'un membre	Infections suppuratives diverses	Otite	Total
<i>V. cholerae</i>	3	3	5	0	3	1	15
<i>V. Parahaemolyticus</i>	3	0	0	0	0	0	3
<i>V. Vulnificus</i>	0	0	0	3***	0	0	3
<i>V. fluvialis</i>	1	1**	0	0	0	0	2
<i>V. hollisae</i>	0	1**	0	0	0	0	1
<i>V. Alginolyticus</i>	0	0	1	0	3	6	10

\* Diabète, cirrhose, cancer gastrique, cancer de la prostate, leucémie, myélome, anastomose bilio-digestive, cholécystectomie.

\*\* Patients décédés

\*\*\* Deux patients ont été amputés du membre atteint.

#### 14. Méthodes de détection de *Vibrio* spp

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour la détection et le dénombrement des espèces de *Vibrio*. Le manuel de bactériologie analytique de la FDA décrit les principales procédures pour la détection de *V.vulnificus* et *V. parahaemolyticus* et autres *Vibrio* dans les produits de la mer.

La validation d'un protocole opératoire standardisé est déterminante pour la recherche de ces espèces dont certaines étaient considérées comme non pathogènes. Les quelques procédures de détection qui existent sont spécifiques de *V.cholerae* et *V parahémolyticus* et ne peuvent pas être utilisés pour les autres *Vibrio*.

Les méthodes utilisées pour la recherche des *Vibrio* reposent sur des méthodes de d'énumération, des méthodes de caractérisation biochimique, seule ou couplées à des méthodes génétiques telles l'hybridation ADN/ADN sur colonies ou l'amplification génique (PCR) ou PCR en temps réel (Ottaviani.,D et al., 2003).

Une des méthodes les plus utilisées pour l'énumération des *Vibrio* est la méthode du nombre le plus probable ou MPN (Most Probable Number) ou MPN pour l'énumération des *Vibrio*. Brièvement, cette méthode repose sur une série de dilutions dans du PBS (Phosphate Buffer Solution), suivie d'une inoculation dans de l'eau peptonée alcaline ou APW et incubation à 35 à 37°C pendant 18h à 24H. Les tubes montrant une croissance sont ensemencés sur une gélose mCPC (Gélose Cellobiose - Polymyxine B - Colistine modifiée), pour l'isolement de *V.vulnificus* et/ou la gélose TCBS pour *Vibrio parahaemolyticus* et autres *Vibrio* après incubation pendant 18 à 24h à 39/40°C (Ottaviani.,D et al.,2003).

Le principe de détection des espèces *Vibrio* dans les denrées alimentaires repose sur un enrichissement dans de l'eau peptonée alcaline ou APW additionnée d'au moins 0,5% de NaCl (en général 2% à 3%) suivi d'un isolement sur gélose TCBS ou autre gélose appropriée. La température d'incubation utilisée en général est de 35 à 37°C mais celles-ci ne permettent pas la croissance de tous les *Vibrio* dont certains nécessitent une plus faible température soit environ 30°C ce qui permet de détecter la majorité des espèces de *Vibrio*.

D'autres milieux d'isolement ont été préconisés comme le mCPC (Gélose cellobiose - polymyxine B - colistine modifiée) ou gélose au cellobiose colistin (CC agar) pour différencier *V.vulnificus* des autres *Vibrio*. Pour faciliter l'identification des vibrios, des tests biochimiques ou de galeries biochimique des entérobactéries (galerie API20E peuvent être utilisés (Ottaviani (D.) et al., 2003) (cf tableau 18).

Comme alternative aux tests biochimiques, la FDA suggère l'utilisation de méthodes génétiques comme l'hybridation avec sondes spécifiques d'ADN marquées à la phosphatase alcaline ou les techniques de polymerase chain reaction (PCR) ou PCR multiplex ou PCR en temps réel.

**Tableau 18**

Caractéristiques biochimiques des *Vibrio* (Anonyme 5)

	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>V.fluvialis</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.hollisae</i>	<i>V.metschnikovii</i>	<i>V.mimicus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
<b>Gélose TCBS</b>	Jaunes	Jaunes	Jaunes	Vertes	Jaunes	Vertes	Vertes	Vertes	Vertes
<b>Gélose Mcpc</b>	Violet	Violet	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Jaunes
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Lysine decarboxylase</b>	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<b>Croissance dans</b>	<b>0% NaCl</b>	-	+	-	-	-	+	-	-
	<b>3% NaCl</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>6% NaCl</b>	+	-	+	+	+	-	+	+
	<b>8% NaCl</b>	+	-	Variable	+	-	Variable	-	+
	<b>10%NaCl</b>	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à 42°C</b>	+	+	Variable	-	Pas fait	Variable	+	+	+
<b>Acide provenant de</b>	<b>Saccharose</b>	+	+	+	+	-	+	-	-
	<b>D-Cellobiose</b>	-	-	-	-	-	-	Variable	+
	<b>Lactose</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
	<b>Arabinose</b>	-	-	+	+	+	-	-	+
	<b>D-Mannose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>D-Mannitol</b>	+	+	+	+	-	+	+	Variable
	<b>ONPG</b>	-	+	+	+	-	+	+	+
	<b>Voges-Proskauer</b>	+	Variable	-	-	-	+	-	-
	<b>Arginine dihydrolase</b>	-	-	+	+	-	+	-	-
	<b>Ornithine Decarboxylase</b>	+	+	-	-	-	-	+	+
<b>Sensibilité a</b>	<b>10 µg de 0/129</b>	Résistant	Susceptible	Résistant	Résistant	Pas fait	Susceptible	Susceptible	Résistant
	<b>150 µg de 0/129</b>	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Pas fait	Susceptible	Susceptible	Susceptible

### **14.1. Méthodes normalisées pour la détection des *Vibrio***

Parmi les techniques de détection utilisées, la méthode canadienne (procédure de laboratoire, microbiologie des aliments ),(MFLP-37, 2006),pour la recherche et la détection de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*, ainsi que d'autres *Vibrio* halophiles, cette méthode se fait en trois étapes successives : un enrichissement en milieu sélectif (EPA), une culture sur géloses d'isolement et identification présomptive et une confirmation par des tests biochimiques, sérologiques et de pathogénicité, Cette méthode s'inspire d'une procédure publiée dans le (BAM) Bacteriological Analytical Manual.(Annexe 2)

Une autre méthode ISO/TS 21872-1 validée en 2006 est préconisée, nécessitant ainsi quatre phases successives, deux enrichissements sélectifs successifs. Le premier enrichissement sélectif consiste à incuber la suspension mère à une température 6h  $\pm$ 1h pour les produits congelés ou à 41,5°C pendant 6h  $\pm$ 1h pour les produits frais, séchés ou salés. Le deuxième enrichissement en milieu sélectif liquide est de transférer 1ml de la culture, obtenue lors du premier enrichissement sélectif et prélevée en surface dans un tube contenant 10 ml d'Eau Peptonée Alcaline Salée. En ce qui concerne, l'isolement et l'identification l'ensemencement se fait en deux milieux sélectifs solides: Milieu (TCBS) aux thiosulfate, citrate, bile et saccharose et la gélose nutritive salée (GNS), et confirmation par tests biochimiques.

### **14.2. Méthodes génétiques pour la détection des *Vibrio***

#### **14.2.1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) conventionnelle est une alternative aux méthodes de culture, mais cette technique nécessite encore d'une part, une étape d'extraction d'ADN, suivie d'une purification ou un processus d'enrichissement et d'autre part, une détection des produits d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose. (Robert-pillot. A ,2006).

La PCR en temps réel, récemment développée, permet de réduire les analyses «post PCR»: la détection des produits d'amplification est réalisée au fur et à mesure de leur formation au cours du cycle. De plus, comme la fluorescence émise augmente proportionnellement à la quantité de produits spécifiques formés, la PCR en temps réel peut être utilisée pour quantifier la concentration de microorganismes initialement présents dans l'échantillon à étudier (Robert-pillot. A ,2006).

### 14.2.2. Principe de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'agent fluorescent, le SybrGreen I, est un agent intercalant qui se lie à l'ADN double brin lors des phases d'hybridation et d'élongation. Durant l'étape de polymérisation, une augmentation du signal d'émission est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité de produits d'amplification formés au cours de la réaction. Plus il y a de matrices à amplifier au début de la réaction, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil «threshold cycle (Ct)» ou «Crossing point (Cp)». La valeur du Ct peut être traduite en résultat quantitatif en le comparant avec les valeurs de Ct obtenues avec différentes quantités connues d'ADN ou de bactéries (Robert-pillot. A ,2006).

### 14.2.3. Séquences amplifiées

La mise au point de la méthode a été réalisée avec deux souches, la souche de *V. parahaemolyticus* porteuse des gènes *tdh* et *trh* (CNRVC 010089) et la souche de *V. cholerae* O1 toxinogène (CNRVC 980324), utilisées sous forme d'ADN purifié, de cultures pures ou de cultures contaminant artificiellement des échantillons d'eau douce ou d'huîtres (Robert-pillot. A ,2006).

Les séquences spécifiques de chaque espèce et de ses facteurs de pathogénicité sont :

- La séquence intergénique d'ARN ribosomal 16S-23S présente chez toutes les souches de *V. cholerae* (sérogroupes O1 et O139 et sérogroupes différents de O1 et O139) spécifique de l'espèce *V. cholerae* (Chun *et al.*, 1999),
- La séquence R72H, de fonction inconnue, spécifique de l'espèce *V. parahaemolyticus* (Lee *et al.*, 1995; Robert-Pillot *et al.*, 2002)
- La séquence spécifique du gène *ctxA* codant pour la sous unité A de la toxine cholérique (Fields *et al.*, 1992)
- Les séquences des hémolysines *tdh* et *trh* (Bej *et al.*, 1999).

**PARTIE  
EXPERIMENTALE**





## 1. Objectifs de l'étude

Si le choléra subsiste principalement dans les pays en voie de développement et que les infections à vibrions non cholériques sont plus rares dans les pays tempérés, le nombre de cas de choléra déclarés à l'OMS en 2006, a augmenté de manière spectaculaire pour atteindre le niveau de la fin des années 1990.

L'intérêt de l'étude des *Vibrio* est donc justifié par leur impact en santé publique, mais également par leur impact économique (Robert-pillot. A ,2006).

En Afrique du Nord, plus particulièrement en Algérie, la recherche et l'importance de *Vibrio* comme contaminants potentiel des produits de la mer reste inconnue.

Cette étude a pour principal objectif de rechercher la présence de *Vibrio* dans les crustacés (crevettes, crabes), les mollusques (moules), et l'eau de mer de la région est du littoral Algérien (Jijel, Colo, Skikda, Annaba, El Kala), d'identifier les souches isolées et de les caractériser. De même l'identification d'autres bactéries isolées sur gélose TCBS a été menée par différents tests biochimiques.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Lieux et périodes de prélèvements**

Les échantillons représentés par les fruits de mer et l'eau de mer ont été prélevés dans 5 régions différentes de la côte Est du littoral Algérien.

Il s'agit de la région de Jijel, de Colo, de Skikda, d'Annaba et d'El Kala

La période d'échantillonnage a été influencée et choisie en fonction du marché de la pêche mais aussi de la disponibilité des moyens d'études (matériel et milieux d'isolement et d'identification).

**La partie expérimentale s'est déroulée en deux périodes:** la première période de Mai 2007 à Juillet 2007 et une deuxième période allant de Décembre 2007 à Mars 2008.

### **2.2. Matériel**

Le matériel utilisé pour les analyses effectuées sur les prélèvements est le matériel classique que l'on utilise en microbiologie alimentaire conformément à la norme ISO 7218 (Annexe1)

### **2.3. Matrices analysées et nombre de prélèvements**

La recherche de *Vibrio* a été réalisée à partir de matrices de fruits de mer et d'eau de mer.

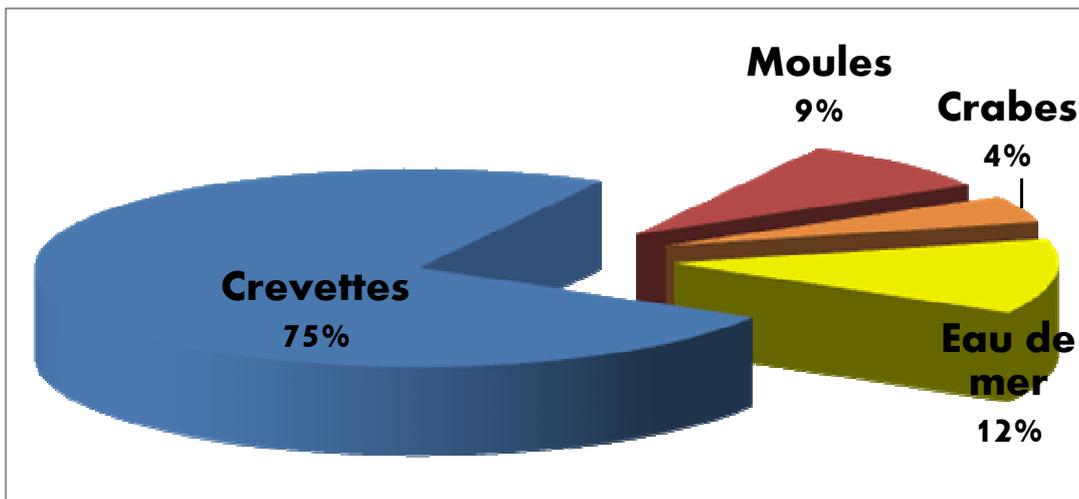
#### **2.3.1. Fruits de mer**

Deux cent (n=200) échantillons de fruits de mer et 28 prélèvements d'eau de mer ont été collectés et analysés dans 5 régions de l'est Algérien. Les différents échantillons concernent en majorité des échantillons des crevettes (n=170). Un total de 10 échantillons de crabes et 20 échantillons de moule ont été prélevés respectivement au mois de juillet 2007 et au mois de février et mars 2008 pour analyses (cf tableau 19, figure 4, tableau 20).

**Tableau 19**

Matrices analysées et nombre de prélèvements

Nature des échantillons		Nombre d'échantillons	Nombre total
Fruits de mer	Crevettes	170	200
	Moule	20	
	Crabes	10	
Eau de mer		28	28



**Figure 4:** Répartition du nombre des échantillons

**Tableau 20**

Répartition et nombre des échantillons de fruits de mer prélevés par période et par mois

Période	Mois	Type d'échantillons	Nombre d'échantillons
2007	Mai	Crevettes	20
	Juin	Crevettes	20
	Juillet	Crabes	10
	Décembre	Crevettes	15
2008	Janvier	Crevettes	45
	Février	Crevettes	35
		Moule	10
	Mars	Crevettes	35
		Moule	10
	<b>Nombre total</b>		<b>200</b>

### 2.3.2. Eau de mer

Vingt huit échantillons d'eau de mer ont été prélevés à la même période et dans les mêmes régions que pour l'analyse des fruits de mer (Jijel, Colo, Skikda, Annaba) sauf pour la région d'El Kala.

L'eau de mer a été prélevée à raison d'un prélèvement par mois et par région (cf tableau 21)

**Tableau 21**

Nombre de prélèvements d'eau de mer

Période	Mois	Jijel	Colo	Skikda	Annaba	Nombre total
2007	Mai	1	1	1	1	4
	Juin	1	1	1	1	4
	Juillet	1	1	1	1	4
	Décembre	1	1	1	1	4
2008	Janvier	1	1	1	1	4
	Février	1	1	1	1	4
	Mars	1	1	1	1	4
	<b>Nombre total</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>28</b>

Pour ce qui est des échantillons de fruits de mer par régions :

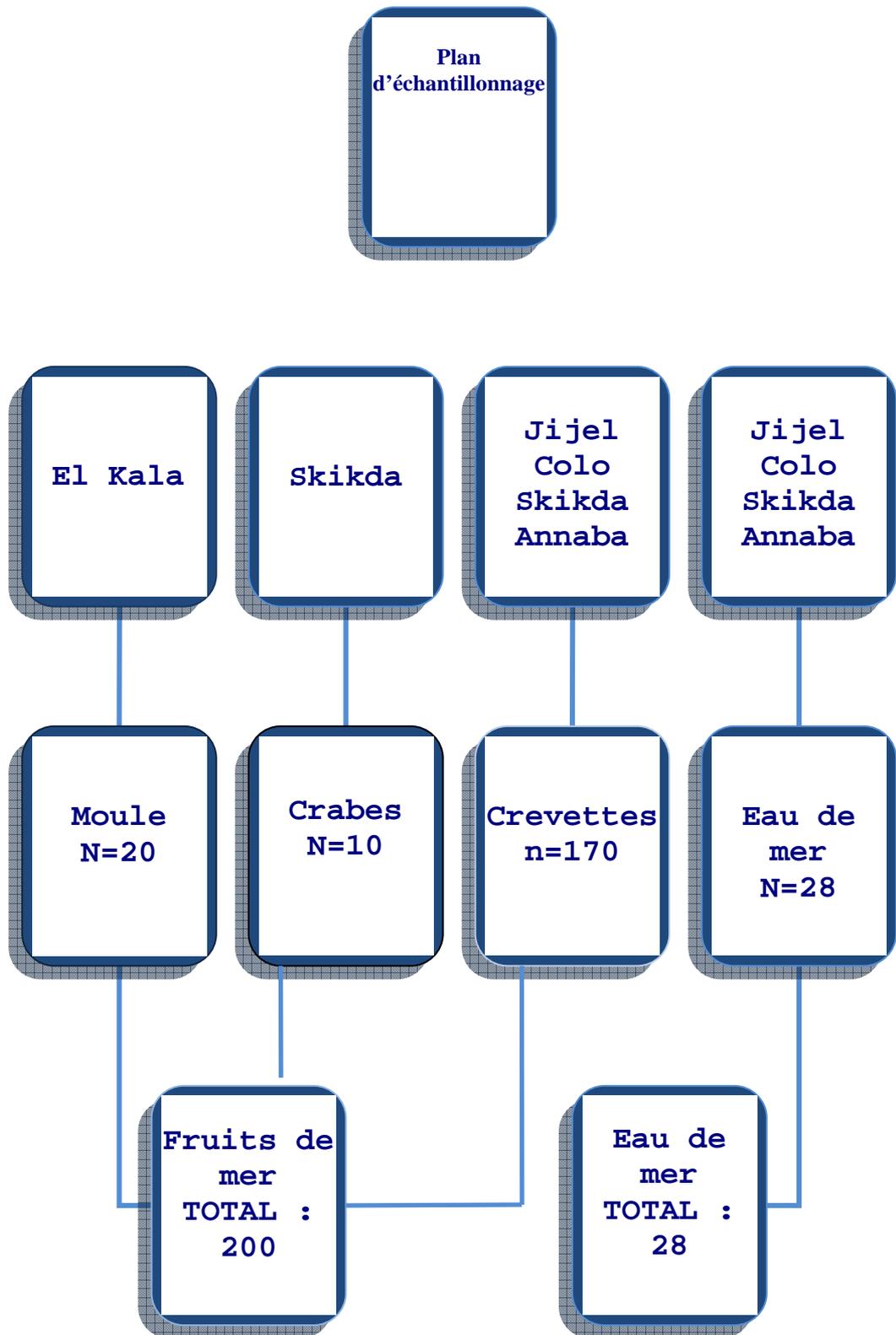
- 44 échantillons ont été prélevés dans la région de Jijel
- 24 échantillons ont été prélevés dans la région de Colo
- 64 échantillons ont été prélevés dans la région de Skikda
- 76 échantillons ont été prélevés dans la région d'Annaba
- 20 échantillons ont été prélevés dans la région d'El Kala

Le récapitulatif de l'échantillonnage est reporté dans le tableau 22

**Tableau 22**

Matrices analysés et nombre de prélèvements par région et par mois

Période	Mois	Régions					El Kala	Total
		Type d'échantillons	Jijel	Colo	Skikda	Annaba		
2007	Mai	Crevettes	4	9	4	3	0	24
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
	Juin	Crevettes	5	6	1	8	0	24
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
	Juillet	Crabes	0	0	10	0	0	14
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
	Décembre	Crevettes	0		1	14	0	19
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
2008	Janvier	Crevettes	14	0	15	16	0	49
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
	Février	Crevettes	7	1	13	14	0	49
		Moules	0	0	0	0	10	
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
	Mars	Crevettes	7	1	13	14	0	49
		Moules	0	0	0	0	10	
		Eau de mer	1	1	1	1	0	
<b>Total</b>			<b>44</b>	<b>24</b>	<b>64</b>	<b>76</b>	<b>20</b>	228



**Figure 5 :** Diagramme des échantillons de fruits et d'eau de mer réalisés dans les 5 régions de l'est Algérien.

## 2.4. Technique d'échantillonnage:

### 2.4.1. Collecte des échantillons et transport

- Les échantillons (crustacés et mollusques) ont été prélevés dans chaque région aseptiquement au niveau du port et des commerces de poissons dans des sacs stomacher stériles et entreposés dans des glacières puis transportés au laboratoire.

- L'eau de mer a été prélevée en surface et en profondeur dans des flacons stériles au niveau des différentes plages de la région de Jijel, Colo, Skikda, Annaba.

Un numéro d'identification ainsi que la date de prélèvement ont été reportés sur chaque prélèvement

-Les prélèvements ont été conservés au réfrigérateur et analysés dans les 24 heures qui ont suivi leur collecte.

## 2.5. Méthodologie de recherche

### 2.5.1. Réalisation de la prise d'essai:

La prise d'essai pour les fruits de mer a été effectuée conformément à ce qui est préconisé dans la norme (ISO 6887 pour la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique).

- Les crustacés: l'animal est pris en entier ou par sa partie centrale y compris les branchies et les intestins (Photo 2)
- Pour les mollusques le prélèvement concerne tout le contenu intérieur de l'animal



**Photo 2:** Manipulation d'un échantillon de crevettes

## 2.5.2. Protocole de recherche de *Vibrio* dans les fruits de mer

La recherche et la caractérisation de *Vibrio* isolées sur gélose TCB ont été réalisées au niveau du laboratoire d'HIDAOA (Institut des Sciences Vétérinaire El Khroub, Constantine).

La méthode d'analyse utilisée dans cette étude est la méthode validée par le laboratoire de microbiologie de la FMV (Faculté de Médecine Vétérinaire) de l'Université de Liège (Anonyme 5). Comme pour toute denrée alimentaire la méthode d'analyse nécessite trois étapes pour la recherche des vibrions : Une étape d'enrichissement en milieu liquide, permettant la revivification des bactéries tout en favorisant la croissance sélective des *Vibrio* par rapport aux autres espèces bactériennes présentes dans l'échantillon, un isolement sélectif sur gélose TCBS, afin d'effectuer une discrimination rapide des *Vibrio* par repérage des colonies suspectes, fermentant le saccharose (colonies jaunes) et des colonies ne fermentant pas le saccharose (colonies vertes) suivie par une confirmation de l'appartenance à l'espèce *Vibrio* par l'étude de l'ensemble des caractères cultureux et biochimiques.

### Enrichissement dans l'Eau Peptonée Alcaline (EPA)

L'enrichissement a consisté en la préparation de deux suspensions mère avec des concentrations différentes de NaCl (1% et 5%) suivant le protocole validé par le laboratoire de microbiologie de la FMV de l'Université de Liège (Anonyme 5)

- ❖ Vingt cinq grammes (25g) de chaque échantillon individuel (Crevettes, Moules et Crabes) constituant la prise d'essai (photo 3), ont été ajoutés à 225ml d'Eau Peptonée Alcaline à 1% de NaCl pour la recherche de *V.cholera* et *V.mimicus* et à 225ml d'Eau Peptonée Alcaline à 5% pour la recherche d'autres *Vibrio* (Photo 4,5)



**Photo 3** : Pesée de 25g de crevettes



**Photo 4**: Suspension mère à 1% de NaCl



**Photo 5** : Suspension mère à 5% de NaCl

Les bouillons d'enrichissement de crevettes et de crabes ont été homogénéisés, pendant deux minutes, au moyen du stomacher péristaltique et pour les moules au mélangeur conformément à la norme ISO 7218.

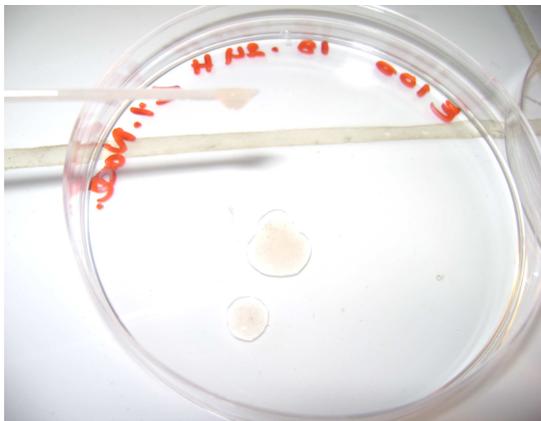
L'incubation des deux suspensions mère a été faite à 42°C pendant 6-8h et 18-24h

#### Isolement sur gélose TCBS

A partir de chaque bouillon d'enrichissement (suspension mère à 1% et suspension mère à 5% de NaCl) incubés 6 à 8h et bouillons incubés 18 à 24 h , un ensemencement en surface et un ensemencement en profondeur ont été réalisés sur gélose TCBS et incubés pendant 18-à 24 h à 37°C ( Photo 6, Photos 7, Photos 8, photos 9, figure 7).



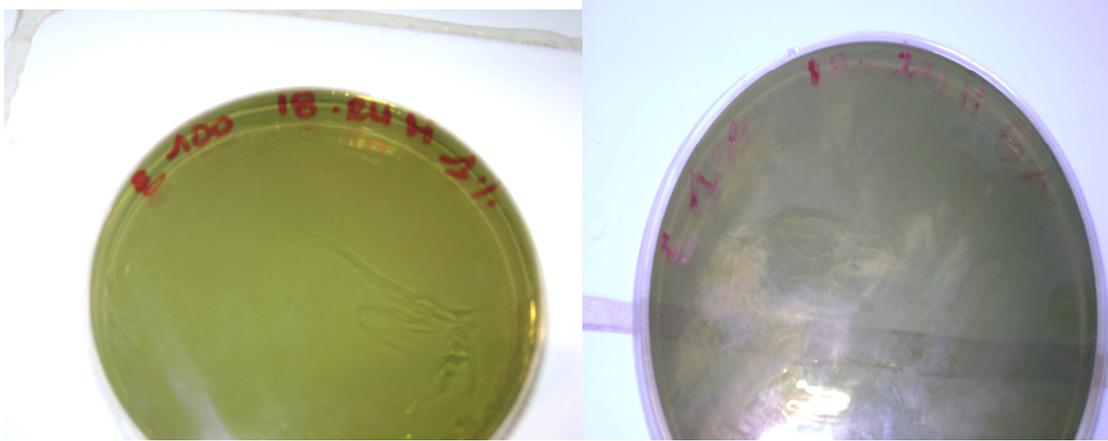
**Photo 6 :** Ensemencement en surface par stries sur gélose TCBS



**Photos 7 :** Ensemencement en profondeur sur gélose TCBS



**Photo 8 :** Ensemencements des deux suspensions mères (1% et 5% de NaCl) incubés 6à8h, sur gélose TCBS et incubés à 37°C pendant 18-24h



**Photo 9** : Ensemencements des deux suspensions mères (1% et 5% de NaCl) incubés 18 à 24h, sur gélose TCBS et incubés à 37°C pendant 18-24h

### Lecture et Purification

Après incubation et isolement sur gélose TCBS, les colonies jaunes ou colonies vertes ont été purifiées sur gélose TCBS, pour caractérisation des *Vibrio* ainsi que pour identification des autres colonies non caractéristiques (opaques, transparentes, oranges).

### Identifications biochimiques des souches caractéristiques

Les résultats ont été confirmés par plusieurs tests:

- Test à l'oxydase:

A l'aide d'une anse bouclée, d'un fil droit en platine, une portion de la culture pure a été prélevée et déposée en stries sur le papier filtre humecté de réactif à l'oxydase.

L'essai est positif si la couleur vire au mauve, violet ou pourpre intense dans les 10 Secondes.

- Etat frais

Une goutte de la culture est déposée sur une lame propre et recouverte avec une lamelle. La mobilité est mise en évidence par examen microscopique.

- Coloration de Gram:

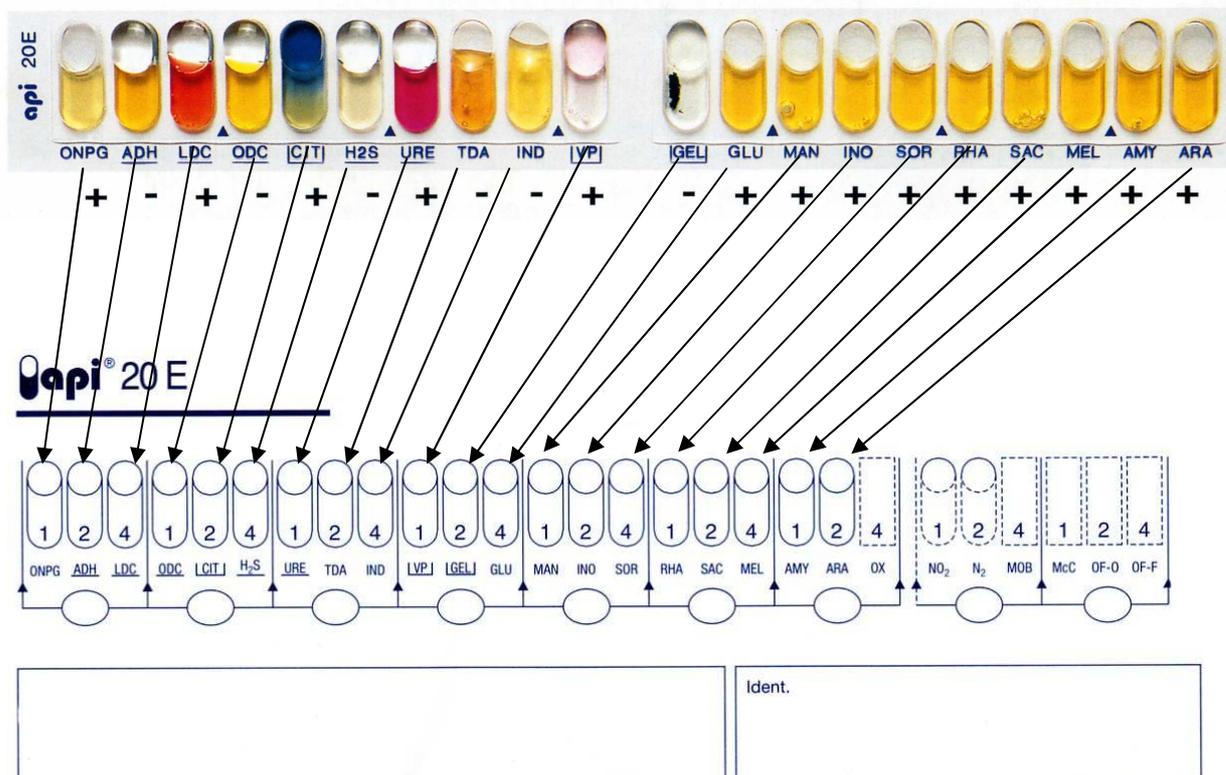
1. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
2. Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée): étaler le lugol et laisser agir 20 secondes; Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone): verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée;
4. Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.
5. Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000).

-KIA, (Kligler Hajna)

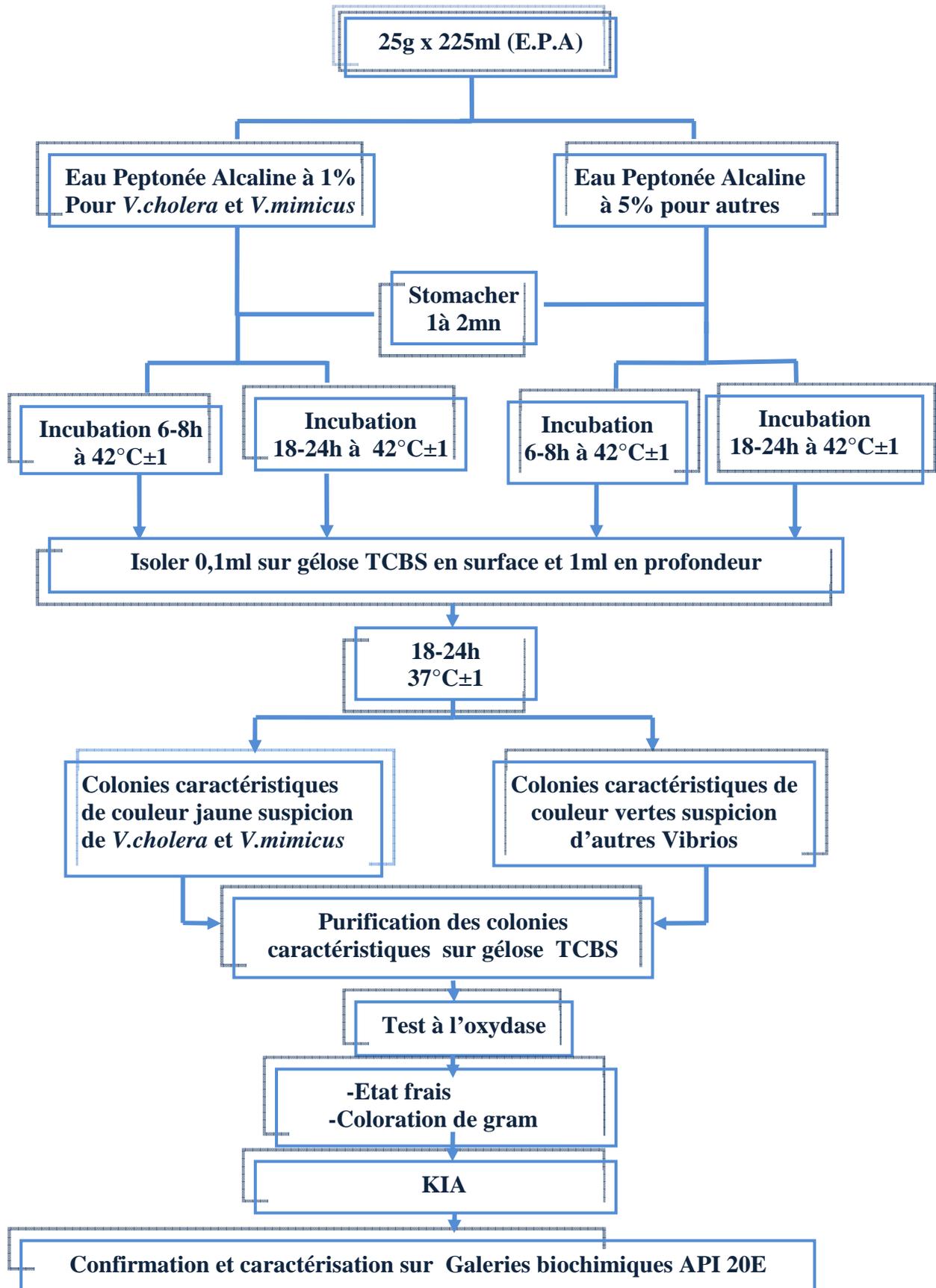
Ensemencer la pente de la gélose par une strie longitudinale et le culot par piqure de la colonie purifiée jusqu'au fond du tube et incuber à 37°C pendant 24h ±3h.

-Galleries API 20E (BIOMERIEUX)

Après purification, une colonie pure caractéristique, Gram négatif, mobile à l'état frais est transférée dans 5 ml d'eau distillée stérile ou d'Eau Peptonée Alcaline à 1% et 5% de NaCl, cette suspension bactérienne est introduite dans chaque micro tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur les côtés pour éviter la formation de bulles. Pour certains caractères. Les micro tubes sont d'huile de paraffine après inoculation de la suspension pour assurer l'anaérobiose et incubation à 37°C pendant 24h, rajouter les additifs nécessaires, puis se référer à la grille de lecture pour interpréter les résultats obtenus.(figure 6).



**Figure 6:** Résultats de la galerie API20E reportés sur la fiche d'identification (Anonyme 6)



**Figure 7:** Schéma pour l'isolement des *Vibrio* dans les aliments (Anonyme 5)

**2.5.3. Protocole de recherche des *Vibrio* dans l'eau de mer (Bruni et al., 1986)**

Les échantillons d'eau de mer ont été analysés pour la recherche des *Vibrio* et soumis au protocole suivant: Cinq cent (500 ml) d'eau de mer à analyser ont été filtrés sur une membrane de 0,45µm qui a été déposée sur gélose TCBS et mise en incubation à 24°C pendant 24h puis à 35°C respectivement pendant 48h. Les colonies (colonies jaunes ou colonies vertes) caractéristiques des *Vibrio* ont été purifiées et isolées sur gélose TCBS, pour identification.

Les résultats ont été confirmés par les tests cités précédemment (page 65)

- Test à l'oxydase, Etat frais, Coloration de Gram, KIA, Galeries API 20E.

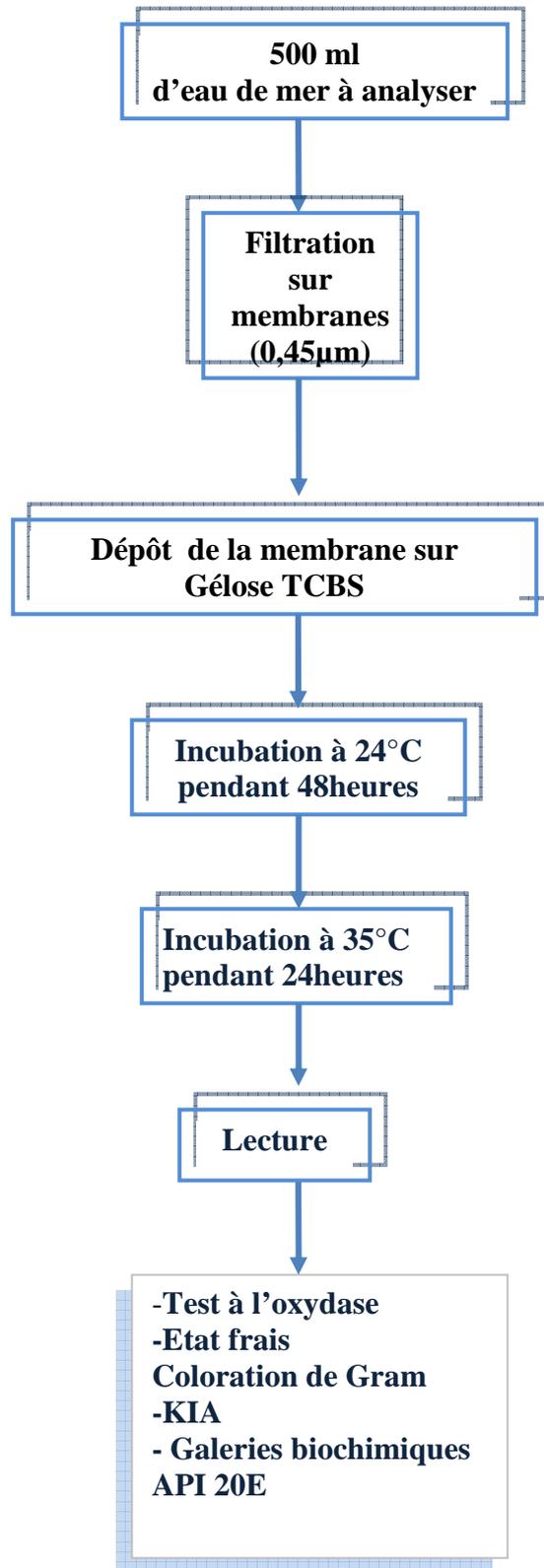
La figure 8 reprend le protocole lié à la technique de recherche.

#### **2.5.4. Etude statistique**

Le test de statistique appliqué dans notre étude est le « test Chi 2 ». Ce test consiste à mesurer l'écart entre une situation observée et une situation théorique et d'en déduire l'existence et l'intensité d'une liaison mathématique.

Dans cette étude ce test a été choisi pour vérifier s'il existe de liaison entre deux variables qualitatives comme par exemple la relation entre

1. Le nombre de bactéries isolées et le type d'échantillonnage (crevettes, moule, crabes),
2. Le nombre de bactéries isolées et la période de prélèvements
3. Le nombre de bactéries isolées et les régions de prélèvements



**Figure 8:** Schéma d'isolement des *Vibrio* dans l'eau de mer (Bruni et al., 1986)

# **RESULTATS**

### 3. Résultats sur la recherche de *Vibrio spp*

#### 3.1. Prévalence de *Vibrio*

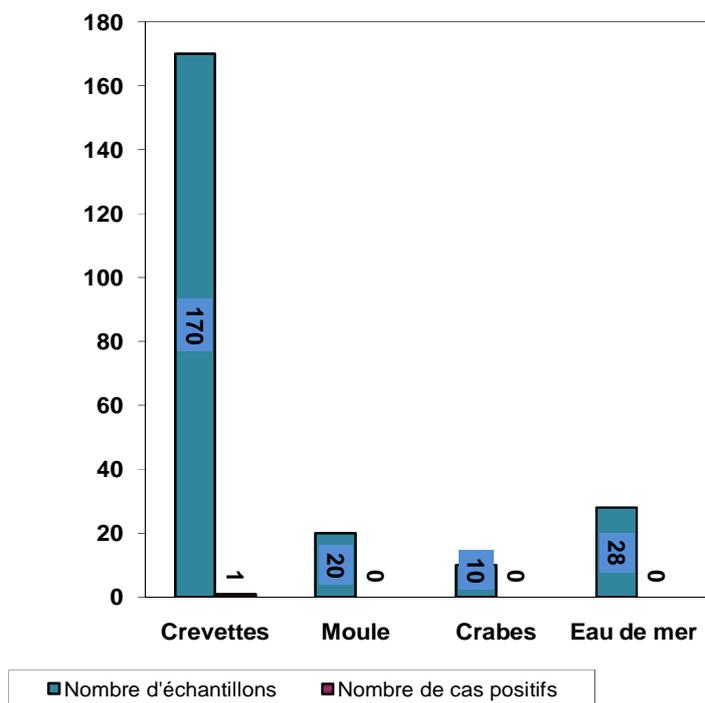
Les tests microbiologiques réalisés sur 200 échantillons de fruits de mer ont montré que seul un échantillon est contaminé par la bactérie du genre *Vibrio*, soit une prévalence de 0,5% (tableau 23). Cette bactérie a été isolée dans un échantillon de crevettes au nombre de 170 (figure 9), soit une prévalence de 0,6%, dans la région de Skikda (tableau 24, figure 10) et pendant le mois de Mai (tableau 25).

Aucune contamination bactérienne n'a été détectée dans les échantillons de moules, de crabes et d'eau de mer

**Tableau 23**

Répartition du cas positif dans les échantillons

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre de cas positifs	Prévalence %
<b>Crevettes</b>	<b>170</b>	<b>1</b>	<b>0,6</b>
Moule	20	0	0
Crabes	10	0	0
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>

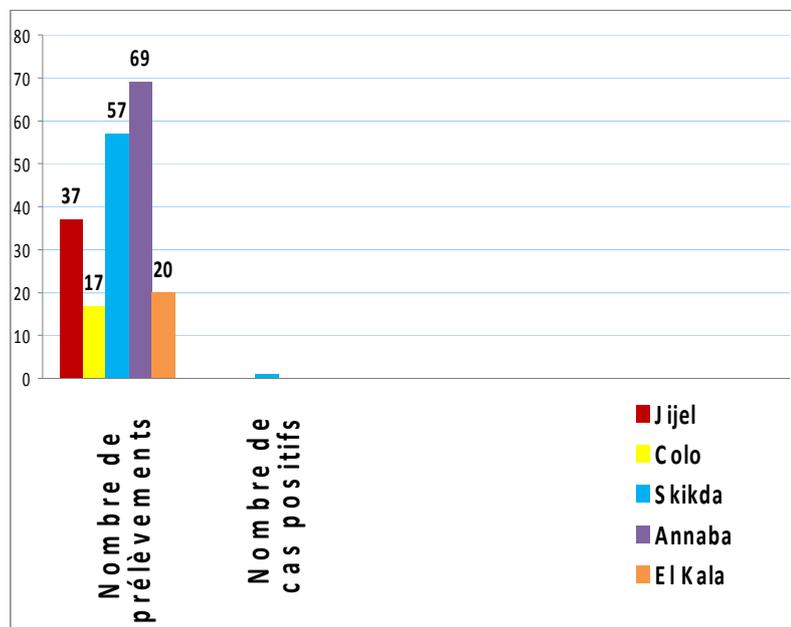


**Figure 9 :** Fréquence du cas positif de *Vibrio* dans les échantillons

**Tableau 24**

Répartition du cas positif isolé dans les fruits de mer, dans les 5 régions

Régions	Nombre d'échantillons	Nombre de cas positifs
(Jijel)	37	0
(Colo)	17	0
<b>(Skikda)</b>	57	1
(Annaba)	69	0
(El Kala)	20	0
<b>Total</b>	200	1



**Figure 10:** Répartition du cas positif isolé dans les fruits de mer dans les 5 régions

**Tableau 25**

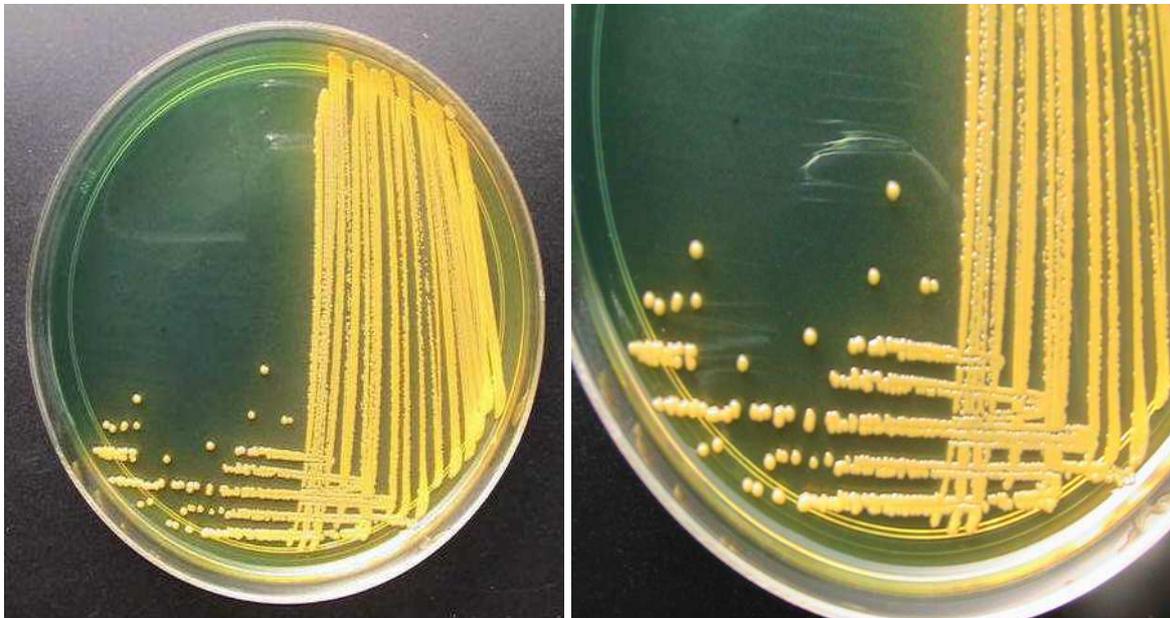
Répartition du cas positif selon les mois

Période	Mois	Nombre d'échantillons	Nombre de cas positifs
2007	Mai	20	1
	Juin	20	0
	Juillet	10	0
	Décembre	15	0
2008	Javier	45	0
	Février	45	0
	Mars	45	0
	<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>1</b>

Aucun test statistique ne peut être appliqué suite au faible nombre de cas positifs de *Vibrio*.

### 3.2. Caractérisation biochimique de la souche de *Vibrio* isolée

Après coloration de Gram, observation de la mobilité, test à l'oxydase et identification biochimique sur galerie API 20E, la bactérie de couleur jaune sur gélose TCBS (photos 10) (Gram-, oxydase+, mobile à l'état frais) , présente un développement dans l'Eau Peptonée Alcaline à 5% de NaCl mais pas à 1% et appartient à l'espèce *Vibrio alginolyticus*. Les caractéristiques biochimiques sont présentées dans les tableaux 26, 27 et les photos 11, 12.



**Photo 10:** Aspect de *Vibrio alginolyticus* sur gélose TCBS

**Tableau 26**

Identification biochimique de la souche *Vibrio alginolyticus*

Bactériologie			Identification biochimique		
Cas positif	Milieu	Couleur des colonies	Code	Id	Espèce
1	TCBS	Jaunes	4146124	90,4%	<i>Vibrio alginolyticus</i>

**Tableau 27**Caractères biochimiques de *Vibrio alginolyticus*

Caractères biochimiques	<i>Vibrio alginolyticus</i>
ONPG	-
ADH	-
LDC	+
ODC	+
CIT	-
H <sub>2</sub> S	-
URE	-
TDA	-
Indole	+
VP	-
Gelatine	+
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Sorbitol	-
RHA	-
Saccharose	+
MEL	-
AMY	-
Arabinose	-



Photo 11: Galerie biochimiques pour identification de *Vibrio alginolyticus*

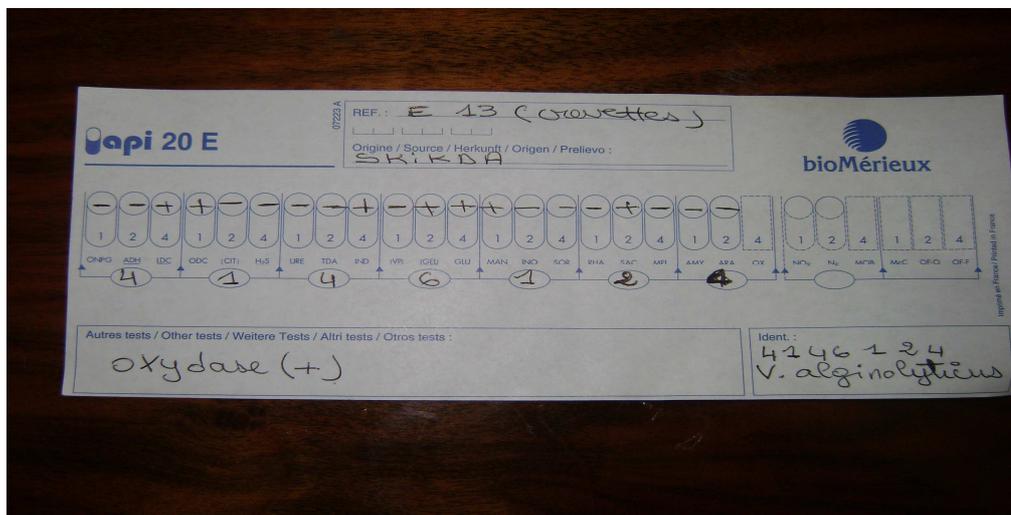


Photo 12: Résultat de la galerie reporté sur la fiche d'identification

#### 4. Caractérisation biochimique des bactéries autres que *Vibrio* isolées sur TCBS.

##### 4.1. Prévalence de la contamination bactérienne dans les échantillons de fruits de mer

Sur les 200 échantillons de fruits de mer et 28 prélèvements d'eau de mer analysés pour la recherche des *Vibrio spp* sur gélose TCBS, 75 échantillons soit une prévalence de 37,5 % pour les fruits de mer et 7 échantillons pour l'eau de mer ont permis de mettre en évidence une contamination bactérienne.

Les échantillons contaminés sont les moules avec une prévalence de 75% (n=20) et les crevettes (35,2%). Aucune contamination bactérienne sur TCBS n'a été mise en évidence pour les échantillons de crabe analysés (Tableau 28, figure 11).

Les échantillons de crevettes les plus contaminés ont été prélevés dans la région de Colo soit 76,4 % (n= 17) suivie par la région de Skikda 34% (n=37) et par ordre décroissant, de Jijel (27% , n=57 ) et de Annaba ( 26%,n= 69)

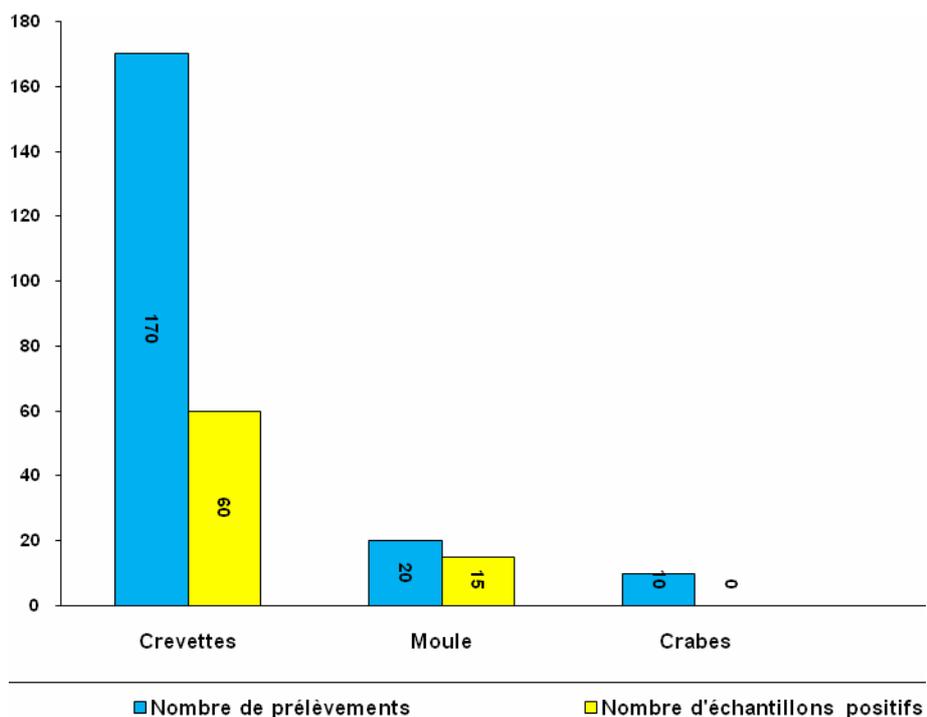
Les moules contaminés à 75% (n= 20) proviennent de la région d'El-Kala (cf tableau 30).

**Tableau 28**

Répartition des échantillons positifs isolés dans les fruits de mer

Fruits de mer	Nombre de prélèvements	Nombre d'échantillons positifs	Prévalence %
Crevettes	170	60	35,2
Moule	20	15	75
Crabes	10	0	0
<b>Total</b>	200	75	37,5

L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus montre qu'il y a une différence significative ( $P < 0,05$ )



**Figure 11:** Répartition des échantillons positifs dans les fruits de mer

**Tableau 29**

Répartition des échantillons de fruits de mer contaminés par région

Régions	Type des échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Prévalence %
Région 1 (Jijel)	Crevettes	37	10	27
Région 2 (Colo)	Crevettes	17	13	76,4
Région 3(Skikda)	Crevettes	57	19	34
	Crabes	10	0	
Région 4(Annaba)	Crevettes	69	18	26
Région 5(El Kala)	Moule	20	15	75
<b>Total</b>		200	75	37,5

L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus montre qu'il y a une différence significative ( $P < 0,05$ )

Les résultats des prélèvements réalisés sur une période de quatre mois (mai, juin, juillet, décembre) de l'année 2007 et au mois de janvier, et mars de l'année 2008 ont montré une contamination nettement élevée (93%) en décembre 2008, une contamination plus faible en mai, juin, mars, janvier et mars (cf tableau 30, 31).

**Tableau 30**

Répartition des échantillons de fruits de mer présentant une contamination pendant les mois de prélèvements

Période	Mois	Nombre d'échantillons de fruits de mer	Nombre d'échantillons positifs	Prévalence%
2007	Mai	20	13	65
	Juin	20	8	40
	Juillet	10	0	0
	<b>Décembre</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>93</b>
2008	Janvier	45	10	23
	Février	45	10	23
	Mars	45	20	45
	<b>Total</b>	200	75	37,5

L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus montre qu'il y a de différence significative ( $P < 0,05$ )

**Tableau 31**

Récapitulatif des échantillons présentant une contamination pendant chaque mois et dans chaque région

Régions	Type d'échantillons	Année 2007			Année 2008			
		Mai	Juin	Juillet	Décembre	Janvier	Février	Mars
<b>Jijel</b>	Crevettes (n=37)	3	4	0	0	3	0	0
<b>Collo</b>	Crevettes (n=17)	8	5	0	0	0	0	0
<b>Skikda</b>	Crevettes (n=67)	0	0	0	0	3	5	11
	Crabes (n=10)	0	0	0	0	0	0	0
<b>Annaba</b>	Crevettes (n=69)	0	0	0	14	4	0	0
<b>El Kala</b>	Moule (n=20)	0	0	0	0	0	7	8

#### **4.2. Contamination bactérienne dans l'eau de mer**

Les résultats des vingt huit échantillons d'eau de mer analysés à raison d'un prélèvement par mois (7 mois) et par région ont montré une contamination bactérienne aux mois de mai, de juin et de janvier pour la région de Skikda et Jijel. Une contamination au mois de Mars pour la région de Skikda. Aucune contamination bactérienne n'a été détectée sur TCBS dans l'eau de mer analysée provenant de la région de Collo et Annaba.

#### **4.3. Caractérisation des espèces bactériennes isolées à partir des fruits de mer**

A partir des 75 échantillons contaminés, la caractérisation (coloration de Gram, état frais et oxydase, galerie Api 20E) des bactéries Gram - isolées sur TCBS a permis d'identifier quatre espèces. Il s'agit par ordre d'importance de *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas Pseudomallei*, *Aeromonas Hydrophila* et *Proteus Vulgaris*

Parmi les Gram + seuls *Staphylococcus* a pu être isolé dans les crevettes et les moules.

#### **4.4. Caractérisation des espèces bactériennes isolées dans l'eau de mer**

Les sept échantillons d'eau de mer contaminés ont permis d'isoler et de montrer la présence de *Pseudomonas Pseudomallei* dans 5 échantillons et celle d'*Aeromonas Hydrophila* dans les deux autres.

La prévalence des espèces bactériennes isolées dans les fruits de mer et l'eau de mer est résumée dans le tableau 32.

**Tableau 32**

Prévalences des espèces bactériennes dans les produits de la mer et l'eau de mer

Espèces bactériennes isolées	Crevettes (n=170)	Prévalences	Moule (n=20)	Prévalences	Eau de mer (n=28)	Prévalences
<i>Citrobacte Freundii</i>	19	11,1%	0	0	0	0
<i>Pseudomonas Pseudomallei,</i>	16	9,4%	2	10%	5	17,8%
<i>Proteus Vulgaris</i>	13	7,6%	0	0	0	0
<i>Aeromonas Hydrophila</i>	5	2,9%	7	35%	2	7,14%
<i>Staphylococcus spp</i>	7	4,1%	6	30%	0	0

#### 4.5. Caractérisation bactériologique et biochimique des espèces bactériennes isolées sur TCBS

Les tableaux 34, 35, 36, résument les caractères bactériologiques et biochimiques des espèces bactériennes isolées sur TCBS.

**Tableau 33**

Caractères bactériologiques et identification biochimique des espèces bactériennes isolées sur TCBS

Caractères bactériologiques		Jaunes – Oranges	06740301	99,8	biochimique	Oxydase	Etat frais	Coloration de Gram					
Type d'échantillons	Régions	Cas positifs	Couleur des colonies	Code	Id %	Espèces							
Crevettes	Jijel	6	Jaunes	0002725	99,9	<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomallei</i>	Positive	Mobiles	Bacilles à Gram négatif, fins et droits				
		4	Jaunes	0002724	99,9								
	Skikda	3	Jaunes	0006425	99,8								
		3	Jaunes	0006424	96,4								
Moule	El Kala	2	Jaunes	0006405	97,3								
Eau de mer	Skikda	2	Jaunes	0006324	99,9								
	Jijel	2	Jaunes	0006327	99,9								
		1	Jaunes	0006326	99,9								
Crevettes	Skikda	3	Jaunes	3004126	99,9					<i>Aeromonas</i> <i>Hydrophila</i>	Positive	Mobiles	Bacilles à Gram négatif, droits à extrémités arrondies
		2	Jaunes	3004127	99,9								
Eau de mer	Skikda	2	Jaunes	3004125	97,4								
Moule	El Kala	2	Jaunes	3006107	97,7								
		5	Jaunes	3005127	98,1								
Crevettes	Annaba	5	Transparentes	2604572	99,2	<i>Citrobacter</i> <i>Freundii</i>	Négative	Mobiles	Bacilles à Gram négatif, droits				
		3	Transparentes	2604553	99,8								
		1	Transparentes	2604533	99,9								
		3	Transparentes	2604513	99,9								
		2	Transparentes	2604512	89,4								
	4	Transparentes	2704513	97,2									
	Skikda	1	Transparentes	3704573	98,6								
Crevettes	Skikda	7	Opaques			<i>Staphylocoque</i> <i>spp.</i>	Négative et Catalase +	Immobilés	Coques à Gram positif, arrondis et en grappe de raisin				
Moule	El Kala	6											
Crevettes	Colo	5	Jaunes – Oranges	0672020	99,9	<i>Proteus</i> <i>Vulgaris</i>	Négative	Très mobiles	Bacilles à Gram négatif				
		3	Jaunes – Oranges	0676031	99,9								
		1	Jaunes – Oranges	0676001	99,9								
		2	Jaunes – Oranges	0674031	99,9								

Les espèces retrouvées ont les caractéristiques d'identification suivantes:

- Culture positive sur eau peptonée à 1% de NaCl
- Culture négative sur eau peptonée à 5% de NaCl

**Tableau 34**

Résultats sur KIA

Bactéries	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	<i>Citrobacters freundii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Fermentation du glucose	-	+	-	+
Fermentation du lactose	-	-	-	-
Production de H <sub>2</sub> S	-	+	-	+

**Tableau 35**

Caractères biochimiques des espèces bactériennes isolées sur TCBS

	<i>Pseudomonas Pseudomallei</i>	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	<i>Citrobacters freundii</i>	<i>Proteus Vulgaris</i>
ONPG	-	+	+(-)	-
ADH	-	+	+	-
LDC	-	-	-	-
ODC	-	-	+(-)	-
CIT	-	-	+(-)	+
H <sub>2</sub> S	-	-	+	+
Urée	-	-	-	+
TDA	-	-	-	+
Indole	-	-	-	+
VP	+(-)	-	-	-
Gelatine	+	-	-	+
Glucose	+(-)	+	+	+(-)
Mannitol	+(-)	+	+	-
Inositol	+(-)	-	+(-)	-
Sorbitol	+	-	+	-

# **DISCUSSION**

## 5. Intérêt de l'étude

Parmi les agents responsables de maladies et de toxi-infections alimentaires, les *vibrio* constituent dans de nombreux pays et particulièrement au Japon et en Amérique du Nord, un réel problème de santé publique en raison de la consommation accrue de produits de la mer, en particulier de produits crus. En général les gastro-entérites ou les septicémies font suite à la consommation de produits de la mer crus (huîtres principalement ou peu cuits (coques, crevettes, crabes...), ou recontaminés après cuisson. Les poissons sont moins souvent incriminés que les mollusques et les crustacés tandis que les humains peuvent demeurer porteurs sains pendant une ou deux semaines (Desenclos J.C, 1993).

De plus, outre l'importance de *Vibrio cholerae* (le plus anciennement connu), les recommandations de la FAO (Food Administration Organisation) ont pour objectif de mettre en œuvre les premières étapes d'une évaluation des risques pour *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche qui auraient le plus d'impact sur la santé publique et/ou le commerce international. L'approche est de quantifier les maladies causées par *Vibrio* spp. dans différents pays suite à la consommation de différents produits de la pêche. Trois espèces *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et *Vibrio cholerae* ont été considérées comme espèces responsables de la plupart des maladies causées par *Vibrio* spp (Bonhomme A, 2003).

Tous ces différents aspects ont suscité l'intérêt que nous avons accordé à la recherche d'un des agents contaminants liés aux produits de la mer d'autant plus justifiée par le fait qu'en Algérie, très peu d'études ont été consacrées à la recherche de ces agents pathogènes du fait probablement de la disponibilité des moyens nécessaires et de la complexité de la méthodologie de recherche.

## 6. Méthodologie d'échantillonnage

### ➤ Lieux choisis

En Algérie, le secteur de la pêche (jusqu'ici délaissé) par les programmes publics est en plein essor car de nombreux ports de pêche sont modernisés ou en cours de modernisation sur le littoral algérien ce qui accélère la dynamique économique dans ces régions.

Notre étude s'est limitée à la région Est du littoral algérien et dont la production halieutique est de l'ordre de 13621.12 tonnes sur une production totale de 65626.81 tonnes (Anonyme 1).

### ➤ Choix du type et nombre d'échantillons analysés

Les crustacés marins, c'est-à-dire, le plus souvent, les crevettes, les crabes ou les plats préparés à partir de ces produits, ont été responsables de nombreuses poussées épidémiques d'origine alimentaire dans le monde. L'épidémiologie montre que ce type de produit a été la cause d'empoisonnements alimentaires dus à la prolifération d'organismes entéropathogènes parmi lesquels les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae*, et de Gram+ principalement *Staphylococcus aureus* (China et al., 2003). Les crustacés et les mollusques sont assimilés à des filtres qui accumulent de manière biologique des micro-organismes pathogènes et des substances toxiques. Ces micropolluants peuvent être natifs des habitats aquatiques; dérivés de la pollution ou introduits lors du débarquement, du transport et de la transformation.

Dans la présente étude, le nombre de prélèvements effectué par région et par mois a été fonction de l'approvisionnement en produits de la pêche.

De même, des prélèvements d'eau de mer ont été prélevés chaque mois dans chaque région pendant la durée de l'étude car parallèlement à la contamination des produits de la pêche, l'eau de mer peut révéler une forte présence de *Vibrio* spp. (Baffone.W. et al., 2001).

## 7. Méthodologies de recherche

Comme dans toute denrée alimentaire, trois étapes sont nécessaires à la recherche des bactéries dans les aliments. Elles consistent en:

- Une culture d'enrichissement en milieu liquide, permettant la revivification des bactéries recherchées tout en favorisant la croissance sélective.
- Un isolement sur gélose sélective, afin d'effectuer une discrimination rapide des bactéries par repérage des colonies suspectes,
- Une confirmation de l'appartenance des bactéries par l'étude de l'ensemble des caractères culturels et biochimiques.

### ➤ Méthode de recherche de la présence de *Vibrio* dans les fruits de mer

En l'absence de normes spécifiques, il existe une très grande diversité de méthodes d'analyses pour la mise en évidence des *Vibrio*, parmi lesquelles les modes opératoires standardisés peuvent servir de référence de la Food and Drug Administration (FDA 1998), et du Nordic Committee on Food Analysis (NMKL, 1997) et la méthode canadienne (MFLP-37, 2006) (Robert-pillot. A, 2006).

Dans la présente étude, la technique utilisée est la méthode horizontale pour la recherche de *Vibrio spp*, méthode validée par le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'université de Liège (laboratoire accrédité pour la validation des méthodes bactériologiques dans les denrées alimentaires). Cette technique s'est révélée moins sélective et moins sensible car elle a permis d'isoler d'autres espèces bactériennes dont la morphologie est comparable à celle de *Vibrio spp*.

**L'eau peptonée alcaline salée a été utilisée lors de la présente étude comme milieu d'enrichissement** qui a consisté en la préparation de deux bouillons avec des pourcentages différents de NaCl (1% et 5%) car certaines espèces de *Vibrio* sont halophiles ( *V.cholera* et *V.mimicus* ), et d'autres pas. Le besoin en NaCl pour les *V. cholerae* est de 5-15 mM, alors que pour la croissance de *Vibrio parahaemolyticus*, la concentration minimale est de 0,5% de NaCl c'est à dire 140-260 mM (China.B et al., 2003). Cependant cet organisme est rapidement inactivé par l'eau distillée. Il semblerait que quelques souches soient capables de croître très faiblement entre 8 et 10% de NaCl et très rarement à 13% (Twedt R.M, 1989).

*Vibrio vulnificus* est halophile obligatoire, la concentration optimale en NaCl à utiliser se situe entre 1 et 3% et il ne peut croître pour une concentration inférieure à 0,1% ou supérieure à 5%. *V. vulnificus* est ainsi qualifié comme étant « modérément halophile » en comparaison à *V. parahaemolyticus* (Oliver J.D, 1989).

Selon Holt et al., 1994, les solutions ioniques stimulent la croissance de toutes les espèces et sont absolument indispensables pour la plupart d'entre elles. D'après Twedt R.M, 1989, les dix espèces de *Vibrio* connues pour causer des gastro-entérites peuvent être classées en cinq sous-groupes sur la base de sept tests et l'absence de croissance dans un milieu contenant 0% de NaCl permet de différencier les huit espèces halophiles du groupe comprenant *Vibrio Cholerae* et *V. mimicus*

Le milieu d'enrichissement utilisé lors de notre étude a permis de mettre en évidence une multiplication croissante d'espèces bactériennes peu halophiles appartenant à la famille des vibrionacées comme *Aeromonas*, et à d'autres familles de bactéries. Ces bactéries se sont multipliées dans le bouillon d'enrichissement à 1% de NaCl.

**Le milieu d'isolement utilisé est le milieu TCBS** (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose, Diagnostics Pasteur, réf. 69456; Oxoid, réf. CM 333; Merck, réf. 10263), qui est le milieu de référence préconisé pour la détection et l'isolement des *Vibrio* pathogènes (norme NF ISO 8914 et recommandations Organisation Mondiale de la Santé). La forte concentration en bile et en citrate associée à un pH élevé (pH = 8,6) permet l'élimination de nombreuses bactéries. La principale source de carbone est le saccharose. L'utilisation du saccharose se traduit par une diminution du pH et par le virage de l'indicateur de pH du vert au jaune. Les colonies saccharose positives, telles que plusieurs espèces de *Vibrio* notamment *V. cholerae*, *V. alginolyticus* apparaissent donc jaunes. Les colonies saccharose négatives, comme *V. parahaemolyticus*, apparaissent vertes. Toutefois, ce milieu n'est pas très sensible, ni très spécifique et de nombreux faux positifs ont été détectés (Anonyme 4).

Lors de notre étude, des colonies similaires aux *Vibrio* ont été identifiées telles que les colonies de *Proteus* qui donnent des colonies jaunes semblables aux colonies de *Vibrio* saccharose positive, ainsi que les *Pseudomonas* qui donnent aussi des colonies jaunes sur gélose TCBS.

Un des autres inconvénients du milieu TCBS est qu'il ne permet généralement pas de discriminer entre les différentes espèces de vibrions. Il conviendrait en effet de pouvoir identifier l'espèce de *Vibrio* présente dans l'échantillon analysé. En particulier, il serait avantageux de pouvoir identifier la présence et de discriminer *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*.

L'identification des diverses espèces de vibrions sur milieu TCBS est donc présomptive et doit être confirmée par des tests supplémentaires.

Comme autre milieu sélectif la gélose TTG (Taurocholate-Tellurite-Gélatine) est également utilisée, mais est relativement fastidieux à préparer, nécessitant des contrôles réguliers et un dosage rigoureux du tellurite de potassium.

Des études récentes ont permis de proposer un nouveau milieu de culture, pour la détection et/ou la discrimination de bactéries du genre *Vibrio*, caractérisé en ce qu'il comporte, dans un milieu de culture de *Vibrio*, au moins un agent chromogène (Anonyme 4).

Le milieu chromogénique CHROMagar *Vibrio* sélectif permet la différenciation de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae* par rapport aux autres espèces de *Vibrio*. *V. parahaemolyticus* apparaît sous forme de colonies mauves, *V. vulnificus* et *V. cholerae* produisent des colonies bleues tandis que d'autres espèces telles que *V. alginolyticus* forment des colonies incolores. Le principe de ce milieu est basé sur la détection simultanée des activités  $\beta$ -glucosidase, spécifique de *V. parahaemolyticus*, et de la  $\beta$ -galactosidase, spécifique de *V. cholerae* et *V. vulnificus*, en présence d'une forte concentration en saccharose (Anonyme 4).

Selon Robert-pillot. A, 2006, Aucune méthode de référence n'est disponible pour le dénombrement des *Vibrio* dans les produits de la pêche et il n'existe pas de corrélation entre la dynamique des populations de *Vibrio* et celles des indicateurs de pollution fécale habituellement utilisés pour juger de la qualité sanitaire de l'eau ou des aliments.

Une nouvelle norme ISO/TS 21872-1, validée en 2006, préconise quatre phases successives car les *Vibrios* spp, peuvent être présents en petit nombre et sont souvent accompagnés d'un nombre beaucoup plus grand d'autres microorganismes appartenant à la famille des Vibrionacées ou à d'autres familles. Par conséquent, deux enrichissements sélectifs successifs sont nécessaires pour rechercher les organismes cibles. Le premier enrichissement

sélectif consiste à incuber la suspension mère à une température  $6h \pm 1h$  pour les produits congelés ou à  $41,5^{\circ}\text{C}$  pendant  $6h \pm 1h$  pour les produits frais, séchés ou salés. Le deuxième enrichissement en milieu sélectif liquide est de transférer 1ml de la culture, obtenue lors du premier enrichissement sélectif et prélevée en surface dans un tube contenant 10ml d'Eau Peptonée Alcaline Salée. En ce qui concerne, l'isolement et l'identification l'ensemencement se fait en deux milieux sélectifs solides:

- Milieu (TCBS) aux thiosulfate, citrate, bile et saccharose
- Un autre milieu sélectif solide approprié, en complément du milieu TCBS est la gélose nutritive salée (GNS).

**Les méthodes classiques d'identification** bactérienne peuvent conduire à une confusion entre les espèces. Comme alternative à ces méthodes d'identification, la recherche par la technique PCR de séquences génomiques spécifiques de l'espèce, et de gènes associés à la virulence est plus spécifique. Ainsi, l'appartenance d'une souche à l'espèce *V. parahaemolyticus*, phénotypiquement très proche ne diffère biochimiquement que par la fermentation d'un sucre de l'espèce *V. alginolyticus* et peut être confirmée par l'amplification de la séquence R72H spécifique de l'espèce *V. parahaemolyticus*. De ce fait, la séquence R72H est un bon marqueur d'identification de *V. parahaemolyticus*. (Robert-pillot, 2006)

Une étude réalisée au Centre National de Référence des *Vibrio* et du cholera, a permis de montrer que 10% des souches identifiées biochimiquement comme *V. alginolyticus* appartenaient en fait à l'espèce *V. parahaemolyticus* (CNR, 2006).

En conclusion l'identification est difficile et la reconnaissance des colonies de *Vibrio* est en grande partie une question d'expérience et leur aspect peut quelque fois varier non seulement d'une espèce à une autre, mais également d'un lot de milieu de culture à un autre (ISO/TS 21872-1).

➤ Recherche des *Vibrio* dans l'eau de mer

Il n'existe pas de norme pour la recherche des *Vibrio* dans l'eau de mer cependant la méthode que nous avons utilisée est celle préconisée par Bruni et al., 1986, à travers son étude portant sur l'identification de 110 souches isolées à partir d'échantillons d'eau de mer, d'eau de bassin d'élevage. Cinquante neuf (59) souches de *Vibrio anguillarum*, 13 souches *Vibrio parahemolyticus*, 6 souches *Vibrio alginolyticus* et 32 souches autres *Vibrio* ont pu être isolées et caractérisées.

## 8. Prévalence et contamination par *Vibrio* spp

Sur 200 échantillons de produits de la mer analysés, 1 échantillon, soit une prévalence de 0,5% était contaminé par *Vibrio*. Il s'agit d'un échantillon de crevettes (n=170) avec une prévalence de 0,6%, prélevé dans la région de Skikda au mois de mai. Aucun échantillon positif pour la recherche de *Vibrio* n'a été mis en évidence dans les moules (n= 20), et dans les crabes analysés (n=10).

De même, aucun *Vibrio* n'a été mis en évidence dans l'eau de mer (n=28), lors de notre étude. Cependant, la présence des *Vibrio* dans l'eau de mer et en méditerranée (côte algérienne) est bien réelle. *Vibrio alginolyticus* a été isolé dans la mer méditerranéenne, en Espagne (Prieto.R et al., 1993) et en Italie (Caruso, G., R. et al., 1998).

Des études de prévalence ont mis en évidence différents taux de contamination par les espèces de *Vibrio* dans les fruits de la mer et l'eau de mer :

En France, en 2001, lors de cas d'infections à *Vibrio* survenues dans l'eau de mer chez des baigneurs, la présence de vibrions a été mise évidence dans 22 prélèvements d'eau de la mer Méditerranée de 20 villes côtières. Six souches appartenant à 3 espèces de *Vibrio* ont été isolées : 2 *V.cholerae* (non-01/non-0139), 3 *V.parahaemolyticus* et 1 *V. alginolyticus* (Aubert.G et al., 2001).

En France, durant 1999, un total de 193 souches de *Vibrio* isolées dans des produits de la mer importés de 9 pays (Chine, Equateur, Inde, Iran, Madagascar, Sénégal, Tanzanie, Thaïlande et Viet-nam) ont été envoyées au Centre National de Référence des Vibrions et du choléra. Parmi ces souches, 94 sont des *V. parahaemolyticus*, 53 *V. alginolyticus*, 26 *V. cholerae*, 3 *V. metschnikovii*, 2 *V. mimicus* et 15 souches d'autres espèces de *Vibrio*. (European Commission, 2001)

Aux Pays-Bas, un total de 91 échantillons de coquillages a été examiné d'Août à Octobre 1999. *Vibrio alginolyticus* est l'espèce prédominante (44%) suivie par *V. parahaemolyticus* (27,4%), d'autres espèces de vibrions (6,5%), *Vibrio metschnikovii* (1%) (Tilburg *et al.*, 2000).

En Croatie, durant l'été 2000, 117 échantillons de poissons marins, crevettes et mollusques bivalves ont été collectés dans la mer Adriatique. *Vibrio parahaemolyticus* était prédominant (47%) suivi par *Vibrio vulnificus* (37,6%), *V. alginolyticus* (3%) et autres *Vibrio* (12,8%) (European Commission, 2001).

Durant 1999 et 2000, l'Ecole des Sciences Vétérinaires de Norvège a étudié 152 isolats de *Vibrio* que lui ont soumis les autorités locales de contrôle des denrées alimentaires pour vérification. Parmi ces souches, 37% correspondaient aux *V. cholerae* non-O1 et non-O139, 33% à *V. alginolyticus*, 24% *V. parahaemolyticus*, 3% *V. vulnificus*, 2% *V. mimicus* et 1% *V. harveyi* (European Commission, 2001).

Dans une autre étude réalisée de mai à septembre 2001, sur l'eau de mer et les moules collectées en mer Ionienne en Italie. 1186 souches de *Vibrio spp.* ont été isolées (40% dans l'eau de mer et 60% dans les moules). *Vibrio alginolyticus* a été détecté dans l'eau de mer et les moules tandis que *V. vulnificus*, *V. hollisae* n'ont été isolés que dans les moules. *Vibrio alginolyticus* constituait l'espèce prédominante, aussi bien dans l'eau que dans les moules (35,4% et 37,5% respectivement). *Vibrio parahaemolyticus* a été détecté dans 5% des moules, *V. hollisae* et *V. fluvialis* dans 1,5%, *Vibrio mimicus* et *Vibrio vulnificus* ont été détectés dans 4,4% des prélèvements de moules (Bonhomme A, 2003).

La recherche d'espèces de vibriens potentiellement pathogènes a été réalisée sur 189 échantillons d'eau et de moules prélevés sur les côtes et dans les estuaires français. Les souches ont été détectées, identifiées et caractérisées par des méthodes biochimiques classiques et la confirmation de l'identification a été effectuée par l'amplification de séquences spécifiques de chaque espèce. *V. alginolyticus* a été l'espèce prédominante (52, 3%), suivie par *V. parahaemolyticus* (5,19%), *V. vulnificus* (10,5%), et *V. cholerae* non-O1/non-O139 (1,5%) (Robert-pillot. A ,2006).

Dans le cadre de contrôle de produits présentés à l'importation en France, 112 souches isolées de produits de la pêche présentés à l'importation ont été étudiées au CNR en 2006. Parmi elles, 108 appartenaient au genre *Vibrio*. Les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* ont été le plus souvent rencontrées (CNR, 2006).

En 1998, en Belgique, un total de 1299 échantillons (de mollusques bivalves vivants, des crustacés et de poissons de différents types) a été testé pour la présence de *V. cholerae*, 311 échantillons pour *V. parahaemolyticus* et 82 pour d'autres espèces de Vibriens. Aucun *Vibrio* n'a été isolé dans ces prélèvements (European Commission, 2001).

En résumé, ces études permettent de constater que les souches prédominantes isolées dans les fruits de mer et l'eau de mer sont différentes selon les régions. Dans certaines régions *Vibrio parahemolyticus* est la souche prédominante suivie par *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio cholerae* (Croatie), alors que dans d'autres régions *Vibrio alginolyticus* est la souche prédominante suivie par *Vibrio parahemolyticus* et d'autres *Vibrio* (Les côtes françaises, Italie, Pays Bas).

De même, dans la présente étude, malgré le faible nombre d'échantillons en fruits de mer analysés, La seule bactérie *Vibrio* isolée appartient à l'espèce *Vibrios alginolyticus*, bacille Gram négatif en forme de virgule, anaérobie, mobile à l'état frais, positive au test d'oxydase , (ONPG -, ADH-, LDC+, ODC+, CIT-,H<sub>2</sub>S-, URE-, TDA-, Indole+, VP-, Gelatine +, Glucose+, Mannitol+, Inositol- , Sorbitol-, RHA-, Saccharose+, MEL-, AMY-, Arabinose-)

Les résultats de prévalence obtenus dans la présente étude sont inférieurs à ceux observés en Grande Bretagne, en France, en Croatie, aux Pays Bas, en Norvège et en Italie et supérieurs à ceux de la Belgique où aucun *Vibrio* n'a été isolé à partir des produits de la mer.

➤ **Importance de la contamination par *Vibrio alginolyticus*:**

*Vibrio alginolyticus* est un hôte normal de la flore marine et est classiquement considéré comme non pathogène chez l'homme. Les quelques infections à *Vibrio alginolyticus* peuvent passer inaperçues et sont rarement suspectées. Elles surviennent après exposition à l'eau de mer ou après contact avec des animaux marins (Campanelli.A et al., 2008).

Les infections à *Vibrio alginolyticus* principalement rapportées sont des otites, des conjonctivites, des pyodermites superficielles et des gastroentérites. Chez les sujets immunodéprimés, elles peuvent devenir graves et potentiellement mortelles. Ce bacille peut infecter les tissus cutanés à partir d'une lésion cutanée. A ce titre, *Vibrio alginolyticus* doit faire partie de la liste des agents pathogènes en cas d'infections cutanées, en particulier chez les malades ayant été en contact avec de l'eau de mer de régions chaudes ou des animaux marins (Campanelli.A et al., 2008).

## **9. Prévalence et identification des autres bactéries isolées**

Sur les 200 échantillons de fruits de mer et 28 prélèvements d'eau de mer analysés pour la recherche des *Vibrio spp* sur gélose TCBS, 75 échantillons ont montré une contamination bactérienne (autre que vibrio) soit une prévalence de 37,5 % pour les fruits de mer et 7 échantillons pour l'eau de mer

Les échantillons contaminés sont par ordre décroissant, les moules suivis des crevettes avec respectivement une prévalence de 75% et de 35,2%). Aucune contamination bactérienne sur TCBS n'a été mise en évidence à partir des échantillons de crabe analysés.

Les échantillons de crevettes les plus contaminés ont été prélevés dans la région de Colo soit 76,4 % (n= 17) suivie par la région de Skikda 34% (n=37), puis dans la région de Jijel (27%, n=57) et de Annaba (26%, n= 69).

Les moules contaminés (75%) proviennent de la région d'El-Kala.

A partir des 75 échantillons contaminés de crevettes et de moule, la caractérisation (coloration de Gram, état frais, oxydase et identification sur galerie Api 20E) des bactéries Gram isolées sur TCBS a permis d'identifier quatre espèces. Il s'agit par ordre d'importance de *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas Pseudomallei*, *Aeromonas Hydrophila* et *Proteus Vulgaris*

Parmi les Gram +, *Staphylococcus* a pu être isolé dans les crevettes et les moules.

Les sept échantillons d'eau de mer contaminés ont permis d'isoler et de montrer la présence de *Pseudomonas Pseudomallei* dans 5 échantillons et celle d'*Aeromonas Hydrophila* dans les deux autres.

L'identification sur galerie API 20 E a permis d'observer des différences dans les caractères biochimiques (telle la fermentation des sucres) au sein d'une même espèce isolée.

- ❖ *Citrobacte freundii* a été isolé dans 11,1% des échantillons de crevettes (n=170) mais pas dans les échantillons de moule et d'eau de mer. Ces entérobactéries sont considérées comme des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et des animaux et sont également isolées du milieu extérieur (sol, eaux, eaux usées, aliments (Euzéby., J.P, 2000a). La première souche de *Citrobacter freundii* a d'ailleurs été isolée de l'eau d'un canal hollandais par Braak en 1928. Chez les poissons, le premier cas d'infection à *Citrobacter freundii* a été observé chez des mûles ou poissons lunes (*Mola mola*) élevés en aquarium. Ultérieurement, l'infection a été décrite chez des salmonidés (saumon de l'atlantique, truite arc-en-ciel), des poissons rouges, des tilapias, des poissons chats et, en Indes, chez des carpes (Euzéby., J.P, 2000a).
  
- ❖ *Pseudomonas Pseudomallei* appelé aussi *Burkholderia pseudomallei* a été isolé dans 9,4% des échantillons de crevettes analysées, 10% dans les moules et 17,8% dans l'eau de mer

*Burkholderia pseudomallei* est une bactérie à gram à Gram négatif, présentes dans le sol (notamment dans la boue et les sédiments) et dans les eaux (eaux stagnantes des mares, des marigots, des retenues d'eau, des rizières, des berges). Ce sont de véritables bacilles hydrotelluriques pouvant vivre en dehors des régions tropicales et résistants très bien au froid. (Euzéby., J.P, 2006).

Il est important de souligner que *Pseudomonas Pseudomallei* est responsable de la maladie de la mélioïdose ou la pseudo morve. L'arrêté du 18 juillet 1994 classe *Burkholderia pseudomallei* au sein du groupe des germes présentant un niveau **de risque 3**. La manipulation des prélèvements et des cultures doit s'effectuer obligatoirement dans un laboratoire du type P3. Au moins deux cas de contamination chez du personnel manipulant des cultures ont été décrits (Euzéby., J.P, 2006).

- ❖ *Aeromonas hydrophila* appartient aux Vibrionnaceae et a été isolée dans 2,9% des échantillons de crevettes, dans 35% des échantillons de moules et 7,14% des eaux de mer analysées. d'eau de mer. L'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, ou le contact avec le micro-organisme par une rupture de la peau, constituent les voies courantes d'infection avancées dans le cas d'*Aeromonas* (Schubert, 1991). On n'a signalé aucune transmission entre personnes. Depuis quelques années, le secteur de la santé publique reconnaît *A. hydrophila* comme un agent pathogène opportuniste; on l'a incriminé comme agent pathogène possible de la gastro-entérite, de la septicémie, de la cellulite, de la colite et de la méningite, et on l'isole souvent dans des infections de plaies subies en milieu aquatique (Krovacek et al., 1992; Gavriel et al., 1998). On l'a aussi incriminé récemment dans des infections respiratoires (Janda et Abbott, 1998).

L'espèce *Aeromonas*, y compris *A. hydrophila*, est très répandue dans l'environnement. Ces micro-organismes ont été identifiés dans des lacs, des rivières, de l'eau de mer, des effluents d'égout et de l'eau potable ( El-Taweel et Shaban, 2001).

- ❖ *Proteus Vulgaris* a été isolé des crevettes (n=170) avec une prévalence de 7,6 %,et pas dans les moules et de l'eau de mer. -*Proteus vulgaris* peut être considéré comme un pathogène opportuniste et est responsable d'infections diverses: (surinfections des plaies, infections cutanées et autres infections et plus rarement, de septicémies et de méningites particulièrement graves chez les nourrissons. Leur rôle dans des gastro-entérites infantiles et dans des gastro-entérites succédant à l'ingestion d'aliments contaminés a été évoqué (Euzéby., J.P, 2000 b).



- ❖ Les Staphylocoques ont été isolés dans des échantillons de crevettes (n=170) avec une prévalence de 4,1% et les échantillons de moules (n=20) avec une prévalence de 30% mais pas dans l'eau de mer.

Les produits de la mer comestibles peuvent être contaminés par les staphylocoques, soit par l'intermédiaire de manipulateurs infectés soit par l'environnement (Galaf.F et Ghannam.S, 2003).

La présence de ces bactéries dans les fruits et l'eau de mer peut s'expliquer soit par les rejets des eaux usées, les eaux de ruissellement ou les eaux des berges, mais n'exclut pas aussi la contamination à partir des manipulations par les pêcheurs ou les commerçants de poissons.

### **10. Etude statistique**

L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus montre qu'il y a des différences significatives ( $P < 0,05$ ) dans le type d'échantillonnages, région et période et cela peut s'expliquer soit par une contamination prédominante dans les crevettes, très élevée plus précisément pendant le mois de décembre et mai dans la région de Colo et El Kala.

## **11. Conclusion**

Cette étude a montré la présence de vibriion dans les crevettes particulièrement prisées par les consommateurs. La prévalence enregistrée est faible soit 0,6%. Ces résultats sont difficilement interprétables du fait du peu d'études consacrées à la problématique des *Vibrio* dans les fruits de mer mais aussi de la méthode de détection sur gélose au TCBS. Nos résultats justifient pleinement la nécessité d'utiliser un milieu chromogénique préconisé dans les normes actuelles.

La présence d'autres bactéries pathogènes isolées sur le milieu TCBS dans les fruits de mer et l'eau de mer nous interpelle sur le danger de ces contaminations pour le consommateur et le manipulateur d'où l'importance et la nécessité d'établir des mesures et des recommandations afin de prévenir tout risque lié à ces produits de la mer par des contaminants biologiques y compris ceux appartenant à l'espèce *Vibrio*. Des études complémentaires basées sur le développement des techniques de recherche (méthodes génétiques) de ces pathogènes sont totalement justifiées.

## Recommandations

Parmi les recommandations des bonnes pratiques d'hygiène et le développement de l'éducation sanitaire qui sont des facteurs très importants en termes de prévention du risque sanitaire :

- ✚ La sensibilisation de la population,
- ✚ Hygiène du personnel
- ✚ L'assainissement et l'hygiène des mains
- ✚ Contrôle des marchés
- ✚ Eviter la consommation de coquillages, de crustacés et de poissons crus ou insuffisamment cuits, éviter la contamination croisée d'autres denrées alimentaires (lavage des mains après la manipulation de produits de la mer).
- ✚ Absence de contact entre les denrées alimentaires et les coquillages ou les poissons crus),
- ✚ conserver au froid les produits de la mer.
- ✚ Hygiène et traitement des eaux de consommation, chloration de l'eau, points d'eau protégés, système adéquat d'évacuation des eaux usées,
- ✚ Eviter les bains lors de blessures préexistantes, manipuler avec précaution les poissons et les coquillages.
- ✚ Une formation et une sensibilisation des médecins afin qu'ils informent leurs patients présentant une pathologie prédisposante (cirrhose du foie, hémochromatose, diabète, antécédents de chirurgie gastrique, cancer, SIDA, traitement par immunosuppresseurs ou corticostéroïdes) du risque auquel ceux-ci s'exposent lors d'un contact avec la mer, la manipulation ou la consommation de produits de la mer.
- ✚ Le classement des zones salubres et des zones insalubres dans les ports

- ✚ La sécurité bactériologique des aliments pour l'export doit être une préoccupation à la fois pour le pays exportateur et importateur.
  
- ✚ La meilleure solution concernant l'importation de produits alimentaires en provenance de zones touchées par le choléra consiste pour le pays importateur à définir, avec l'exportateur, les bonnes pratiques d'hygiène à suivre pendant la manipulation et le traitement afin d'éviter, d'éliminer ou de réduire au maximum le risque de contamination potentielle et à prendre les dispositions voulues pour garantir une bonne application de ces mesures.
  
- ✚ Amélioration des méthodes et des milieux de détection
- ✚ Utilisation de méthodes plus fiables, tel que la PCR et autres méthodes génétiques
- ✚ Instaurer une législation concernant le contrôle des Vibrios dans les produits de la mer et des systèmes de surveillance pour les autres infections à vibrions non cholériques.

## Références Bibliographiques

**Abid. L.** Les épidémies du cholera en Algérie au cours du 19ème siècle. Le guide de la médecine vétérinaire en Algérie, 2006. «[www.santemaghreb.com](http://www.santemaghreb.com)» Consulter le 25 juin 2007 à 23heures.

**AgroVet Magazine.** Le secteur du mois: Risque lié à la consommation des mollusques bivalves, 1997.n°16 p.2.

**Aubert. G. ; Carricajoa. ; Vermensch. R. ; Paul. G. ; Fournier. J. M.** Isolement de vibrions dans les eaux côtières françaises et infection à *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 = Non-01/non-0139 *V. cholerae* infection through contact with sea-water, 2001, La Presse médicale vol. 30, no13, pp. 631-633.

**Aubry. P,** Choléra Actualités 2007, Médecine Tropical, [Médecine tropicale.mht](http://www.medicinetropicale.mht). Consulter le 11 mai 2008

**Anonyme 1:** Amélioration sur l'aménagement des pêches dans la république Algérienne démocratique et populaire. Novembre 2003.<http://www.fao.org/fi/fcp/fr/DZA/body.htm>. Consulter le 10 janvier 2008 à 17h 24

**Anonyme 2:** [http://fr.wikipedia.org/wiki/Vibrio\\_cholerae](http://fr.wikipedia.org/wiki/Vibrio_cholerae) .Consulter le 25 Novembre 2007 à 17h30.

**Anonyme 3:** <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cholera>. Consulter le 25 Novembre 2007 à 17h38

**Anonyme 4 :** <http://www.oxid.com/fr> .Consulter le 1 mai 2008 à 15h41

**Anonyme 5 :** Méthode validée par le laboratoire de l'Université de Liège, SP-VG M006 :1998, Recherche de *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahemolyticus* dans les aliments

**Anonyme 6 :** [pedagogie.acmontpellier.fr/Disciplines/sti/biotchn/presentations/LA\\_GALERIE\\_Api20e.PPT](http://pedagogie.acmontpellier.fr/Disciplines/sti/biotchn/presentations/LA_GALERIE_Api20e.PPT). Consulter le 8 mai 2008 à 20h.

**Baffone W., Citterio B., Vittoria E., Casaroli A., Pianetti A., Campana R., Bruscolini F.** Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*, 2001.**18**:479-488.

**Baffone W., Citterio B., Vittoria E., Casaroli A., Pianetti A., Campana R., Bruscolini F.** Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*, 2001. **18**:479-488.

**Bang W., Drake M.A.** Resistance of cold- and starvation-stressed *Vibrio vulnificus* to heat and freeze-thaw exposure, *Journal of Food Protection*, 2002. **65**(6):975-980.

**Bates (T.C.) et Olivier (J.D.)**. The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Microbiol.*, 2004, **42**, 74-79.

**Bhaskar N., Setty T.M.R., Mondal S., Joseph M.A., Raju C.V., Raghunath B.S. et Inantha C.S.** Prevalence of bacteria of public health significance in the cultured shrimp (*Penaeus monodon*). *Food Microbiology*, 1998, **15**:511- 519.

**Bisharat N., Agmon V., Finkelstein R., Raz R., Ben-Dror G., Lerner L., Soboh S., Colodner R., Cameron D.N., Wykstra D.L., Swerdlow D.L., Farmer III J.J.** Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet*, 1999. **354**:1421-1424.

**Bonhomme Amélie, Jeannine, Charlotte.** Les bactéries du genre *vibrio et la santé publique*. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, 2003, 100p.

**Bryan P.J., Steffan R.J., DePaola A., Foster J.W., Bej A.K.** Adaptative response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Curr. Microbiol.*, 1999. **38**:168-175.

**Campanelli.A., Sanchez-Politta.S., Saurat., J.H.** Ulcération cutanée après morsure de poulpe : infection à *Vibrio alginolyticus*, un pathogène émergent. Service de dermatologie et vénéréologie, hôpitaux universitaires de Genève, 24, rue Micheli-du-Crest, 1211 Genève 14, Suisse. 2008. Vol 135 - N° 3 - p. 225 – 227.

**Castro-Rosas J. Et Escartin E.F.** Adhesion and colonisation of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces. *Journal of Food Protection*, 2002. **65**(3):492- 498.

**CDC,** (1998). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters –Pacific Northwest, 1997. *MMWR*, **47**:457-462.

**CDC**, (1999). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. *MMWR*, **48**:48-51.

**CDC**. Coordinating central pour les maladies infectieuses/Division des maladies bactériennes et mycotiques (2005a). [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibrio\\_paraahaemolyticus\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibrio_paraahaemolyticus_g.htm). Consulter le 21 juillet 2007 à 14:39.

**CDC**. Coordinating central pour les maladies infectieuses/Division des maladies bactériennes et mycotiques (2005b).

[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibriovulnificus\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibriovulnificus_g.htm). Consulter le 21 juillet 2007 à 17 :35.

**China. B., De Schaetzen M.-A., Daube G.** Les mollusques bivalves, des aliments dangereux ? *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 413-422.

**Chun, J., Huq, A. & Colwell, R.R.** (1999). Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2202-2208.

**CNR**, Centre National de Référence des Vibrions et du cholera, Institut Pasteur , Rapport Annuel d'activité,2006.43p.

**Cook D.W.** Refrigeration of oyster shellstock-conditions wich minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food Protection*. 1997. **60**(4):349-352.

**Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas G.J.E., Kirby R.M.** Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*, 2001.**12**:67-71.

**Desenclos J.C.** Epidémiologie des risques toxi-infectieux liés à la consommation de coquillages . *in* : Coquillages. Coordination Panayota Elzière- Papayanni. Informations techniques des services vétérinaires français.1993.p.313-335.

**El-Taweel, G.E. et Shaban, A.M.**). Microbiological quality of drinking water at eight water treatment plants. *Int. J. Environ. Health Res.*, 2001.**11** : 285-290.

**European Commission** . Health & Consumer Protection Directorate-General. *Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus (in raw and undercooked seafood)*. Adopted on 19-20 September 2001.

**Euzéby.,J.P**, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire,(2000a). Ecole Nationale Vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/citrobacter.html>. (Consulter le 2 mai 2008 à 19h04)

**Euzéby., J. P**, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire,(2000b). Ecole Nationale Vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/Proteus.mht>. (Consulter le 2 mai 2008 à 20h)

**Euzéby J.P.M**, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire,2005. Ecole Nationale Vétérinaire, <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/Vibrio parahemolyticus.htm>. (Consulter le 20 juillet 2007 à 23:16).

**Euzéby J.P.M**, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire ,2006. Ecole Nationale Vétérinaire, [http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/Burkholderia Pseudomallei, B\\_ Thailandensis, B\\_ Ubonensis, B\\_ Oklahomensis.mht](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/Burkholderia_Pseudomallei,_B_Thailandensis,_B_Ubonensis,_B_Oklahomensis.mht). (Consulter le 2 mai 2008 à 17h)

**FAO/WHO**. Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods: Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland 23 - 27 July 2001. WHO 2001.<http://www.fao.org/es/ESN/food/riskmracampylobacteren.stm>/  
<http://www.who.int/fsf/Micro/index.htm>. Consulter le 2 Janvier 2007 à 20:08

**Fields, P.I., Popovic, T., Wachsmuth, K. & Olsvik, O.** (1992). Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2118-21

**Fournier J.M.** Choléra. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Maladies Infectieuses, 1996. 8-026-F-10, 5p.

**Fournier J.M. et Quilici M.L.** Infections à *Vibrions* non cholériques. *Encycl Méd Chir* ( Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses,2002. 8-026-F-15, 7p.

**Fournier J.M.** La recherche vaccinale à l'institut pasteur.2006.

<http://www.pasteur.fr/actu/presse/dossiers/vaccins/cholera.html>. Consulter le 21 juillet 2007 à 18 :45.

**Galaf.F et Ghannam.S.** Contribution à l'élaboration d'un manuel et d'un site web sur la pollution du milieu marin, pollution biologique.memoire de troisieme cycle.

Présenté pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Agronomie,Option : Halieutique.2003.40p.

**Gavriel, A.A., Landre, J.P.B. et Lamb, A.J.** (1998). Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 383-392.

**Geneste C., Dab W., Cabanes P.A., Vaillant V., Quilici M.L., Fournier J.M.** Les vibrioses non-cholériques en France :cas identifiés de 1995 à 1998 par le Centre National de Référence. *BEH*, 2000. **9**: 38-40.

**Gjerde J.,Bøe B.** Isolation and characterisation of *Vibrio algynolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* from the Norwegian costal environnement. *Acta. Vet.* 1981.

**Hackney C.R., Ray B., Speck M.L.** Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in and the microbiological quality of seafood in North Carolina. *Journal of FoodProtection*, 1980. **43**:769-772.

**Han J-H, Lee J-H, Choi Y-H, Park J-H, Choi T-J, Kong I-S.** Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins&Proteomics*,2002.**1599**( 1-2):106-114.

**Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T.**in *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology*, Ninth Edition.Williams&Wilkins,1994.

**Honda T., Goshima K., Takeda Y., Sugino Y., Miwatani T.** *Infect Immun.*1976. **13**:163-171.

**Honda T., Ni Y.X. et Miwatani T.** Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 961-965.

**ICMSF**; International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996; *Microorganisms in Foods* Vol.5: Characteristics of Microbial Pathogens. London : Blackie Academic and Professional.

**I.N.S.P**, Institut National de Santé Publique ; *R.E.M.*, Vol XIII, 2002

**ISO/TS 218726-1 :2006 (F)**, *ISO/TC 34/SC9*, Microbiologie des aliments- Méthode horizontale pour la recherche des vibrio spp.potentiellement entéropathogènes- Partie 1 : Recherche de *Vibrio parahemolyticus* et *Vibrio cholera*.

**Jackson J.K., Murphree R.L., Tamplin M.L.** Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish. *J. Clin. Microbiol.*1997. **35**(8):2098-2101.

**Janda, J.M. et Abbott, S.L.** Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect Dis*, 1998.**27** : 332-344.

**Johnson D.E., Weinberg L., Clarkowski J., West P. et Colwell R.R.**Wound infection caused by Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, **20**, 811-812.

**Krovacek, K., Faris, A., Baloda, S.J., Lindberg, T., Peterz, M. et Mansson, I.** Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *J. Food Microbiol.*, 1992. **9**(3): 215-222.

**Kuhnt-Lenz.K, S. Kregel, S. Fetscher, A. Heer-Sonderhoff, W. Solbach,** Sepsis with bullous necrotizing skin lesions due to *Vibrio vulnificus* acquired through recreational activities in the Baltic Sea. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis*. 2004.**23**:49-52

**Lee, C.Y., Pan, S.F. & Chen, C.H.** (1995). Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1311-1317.

**Lee R.J., Younger A.D.** Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International Biodeterioration & biodegradation*, 2002, **50**:177- 183.

**Lesmana M., Subekti D.S., Tjaniadi P., Simanjuntak C.H., Punjabi N.H., Campbell J.R., Oyoyo B.A.** Spectrum of *Vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Bacteriology*, 2002. **43**: 91-97.

**Maciñ M.C., Arias C.R., Aznar R., Garay E., Pujalte M.J.** Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. Vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *Internatl. Microbiol.* 2000. **3**:51-53.

**Madden J.M. et McCardell B.A.** *Vibrio cholerae* . In : Doyle, M.P. (ed.) *Foodborne Food Bacterial Pathogens*, New York : Marcel Dekker, 1989. p 525-542.

**Manuel de Todar de la bactériologie.** Université de Kenneth Todar de © de département de Wisconsin-Madison 53706 de la bactériologie, 2006. *Vulnificus de vibrio, v.vulnificus.htm* consulter le 20 Janvier 2007 à 20h..

**MFLP-37.** Direction générale des produits de santé et des aliments ottawa. Procédure de laboratoire, *Gouvernement du Canada* Partie 1 : détection des espèces de vibrio halophiles dans les fruits de mer . 28p. Le Comité des méthodes microbiologiques Division de l'évaluation Bureau des dangers microbiens. Direction des aliments. Repère postal : 2204A1 Ottawa (Ontario) K1A 0L2, Octobre 2006. [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp-37\\_f.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp-37_f.pdf). Consulter le 23 juillet 2007 à 20:50.

**Ndour C.T., Manga N.M., Kâ R. et al .** L'épidémie de choléra de 2004 à Dakar : Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Med. Trop.*, 2006, **66**, 33-38.

**Nishibuchi. M, Kaper J. B.** Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2093-9.

**Okujo N., Akiyama T., Miyoshi S., Shinoda S., Yamamoto S.** Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrinbound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol.*, 1996, **40**, 595-598

**Oliver J.D., Kaper J.B.** *Vibrio* species. In : Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (Eds.) *Food microbiology – Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington D.C.1997, p. 228-264.

**OMS**, Scientific Working Group (1980) *Bull. WHO* 58, 353-374.

**OMS**. Le choléra en 1994. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1995,**70** :201-208.

**OMS**. Le choléra en 1995. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*,1996, **71** :157-164.

**OMS**. Le choléra en 1997. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*,1998,**73** :201-208.

**OMS**. *Vibrio parahaemolyticus*, Japon, 1996-1998. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, N°**43**,29 octobre 1999.

**OMS**. Le choléra en 2005. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*,2006, **81** : 297–308.

**OMS**. Choléra, 2006. *REH*, 2007, **82**, 273-284.

**Ottaviani (D.), Bacchinocchi (L.), Masini (L.), Leoni (F.), Carraturo (A.), Giammariolo (M.) et Sbaraglia (G.)** : Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic *Vibrio* isolated from seafood. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2001, **18**, 135-140.

**Ottaviani (D.),Massini (L),Bachiocchi (S)**.A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood,Journal of applied Microbiology,2003,**95**,1277-1284

**Pacini F.** Osservazione microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. *Gazette Medica de Italiana Toscano Firenze*, 1854, **6**, 405-412.

**Ragot C., Garnotel E., Vedy S., Morillon M.** Dukoral®, vaccin oral contre le choléra. *Med. Trop.*, 2006, **66**, 237-239.

**Raimondi F., Kao J. P., Kaper J. B., Guandalini S., Fasano A.** Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. *Gastroenterology.*, 1995, **109**, 381-386

**Raimondi F., Kao J.P.Y., Fiorentini. C., Fabri. A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A., Fasano A.** Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infect. Immun.*, 2000, **68**,3180-3185.

**Rakoto Alison A.O., Dromigny J., Pfister P., Mauclère P.** *Vibrio cholerae* à Madagascar : étude d'une souche multirésistante. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 2001, **67**,6-13.

**Reichelt J.L., Baumann P., Baumann L.** *Arch. Microbiol.*,1976. **110**:101-120.

**Ripabelli G., Sammarco M.L., Grasso G.M.** Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in mussels harvested from Adriatic Sea. *Int J. Food Microbiol.*1999. **49**:43-46.

**Richard A,Finkelstein.** Cholerae O1 et O139 de choléra, de vibrio, et d'autres vibrio pathogènes », [vibrio cholera.htm](#), (Consulter le 20 juillet 2007 à 18 :12).

ROBERT -P, **DIPLOME POST-DOCTORAL POUR L'IDENTIFICATION ET LE DENOMBREMENT DE SOUCHES DE VIBRIO CHOLERAET ET DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS DANS L'ENVIRONNEMENT HYDRIQUE ET LES PRODUITS DE LA MER, 2006 ,55P .**

**Shimada T., E. Arakawa, K. Itoh, T. Okitsu, A. Matsushima,Y. Asai, S. Yamai, T. Nakazato, G.B. Nair, M.J. Albert, and Y. Takeda.** Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.*1994,**28**:175-178.

**Thompson, F.L., Iida, T. & Swings, J.** Biodiversity of *Vibrio*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,2004, **68**, 403-431.

**Tilburg J.J.H.C., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., van den Berkmortel D., Rombout J., Jonker K.M., de Boer E.** Presence of *Vibrio* species in shellfish. *Report of the Inspectorate for Health Protection and Veterinary Public Health*, 2000. de Stoven 22, 7206 AX, Zutphen, Netherlands.

**Torres-Vitela M.R., Fernandez-Escartin E.** Incidence of *V. Parahaemolyticus* in raw fish, oysters and shrimps. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1993,**35**(3):276-82.

**Twedt R.M.** *Vibrio parahaemolyticus*. In : Doyle, M.P. (ed.) *Foodborne Food Bacterial Pathogens*, New York : Marcel Dekker, 1989, p 543- 568.

**Val M.E, Marie Bouvier, Javier Campos, David Sherratt , François Cornet, Didier Mazel , François-Xavier Barre.** The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*, *Molecular Cell* 19 Août 2005.**19**(4):559-66

**Véron, M.** La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 1965, **26**, 5243-5246.

# **ANNEXES**

## ANNEXE 1

### Matériels d'analyse et milieux de culture

#### ❖ Appareillage et verrerie

- Balance de précision 0,01g
- Stomacher
- Incubateurs
- Consommables (Ose jetables de 10µl, Ose en platine, boîtes de pétri, Sac stomacher sans filtre, lame porte objet, pipettes souples jetables)

#### ❖ Milieux de culture

Les milieux utilisés:

- Eau Peptonée Alcaline à 1% NaCl
- Eau Peptonée Alcaline à 5% NaCl
- Gélose Thiosulfate, Citrate, Sels biliaires, Saccharose
- Gélose au fer Kligler Hajna
- Réactifs
- Galerie biochimiques d'identification pour entérobactéries + réactifs (galerie API20E)

## Annexe 2

### Protocole de recherche des *Vibrio* dans les Aliments (MFLP-37,2006)

#### I. Recherche des *Vibrio* halophiles

##### 1 .Composition des échantillons

- a) Poisson: tissus de surface, intestins ou branchies
- b) Mollusques: tout le contenu intérieur de l'animal; prendre 10 à 12 animaux ou plus au besoin,

passer au mélangeur, ne pas passer au stomacher, et prélever 50 g du composite pour l'échantillon d'essai

c) Crustacés: animal entier, si possible ou la partie centrale de l'animal, y compris les branchies et les intestins

## **2. Manipulation des unités d'échantillonnage**

2.1. Au laboratoire, avant l'analyse, conserver les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (4 à 8 /C), à la température ambiante ou au congélateur, selon la nature du produit. Décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou dans des conditions (température et délai) où il n'y aura ni croissance, ni mort microbienne.

2.2. Analyser les échantillons décongelés le plus rapidement possible après leur réception au laboratoire afin de minimiser la prolifération et réduire le potentiel de *Vibrio* viables, mais non cultivables (VBNC).

## **3. Préparation des dilutions**

### **3.1 *V. parahaemolyticus* et *V. Cholera***

3.1.1 Préparer de façon aseptique une dilution 1:10 en combinant 50 g de fruits de mer avec 450 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), à pH de 7,2 à 7,5 ou avec 2 % de NaCl dans une jarre de mélangeur stérile ou dans un sac à stomacher. Mélanger au mélangeur les mollusques pendant deux minutes à grande vitesse. Mélanger ou passer au stomacher les autres échantillons pendant deux minutes.

Alternative : Mélanger 50 g de fruits de mer avec 50 ml du liquide de dilution (1:2) puis, faire une dilution 1:5 (20 g de la dilution 1:2 dans 80 ml du liquide de dilution) de l'homogénat pour une dilution totale de 1:10.

3.1.2. Préparer des dilutions décimales (au 1/10) dans 2 % de NaCl ou du PBS à pH de 7,2 à 7,5. Ensemencer des séries de dilution multiple à 3 tubes servant à la détermination du NPP utilisant de l'eau peptonée alcaline (APW) ou de bouillon APS (c'est-à-dire, ajouter des portions de 1 ml pour chaque dilution 1:10 et dilutions plus élevées à des séries de trois tubes contenant 10 ml d'APW ou d'APS). Incuber les tubes de 16 à 18 heures à 35 /C. L'ensemencement des tubes NPP doit être complété en dedans de 15 à 20 minutes après la préparation de la dilution.

### 3.3.2 *V. vulnificus*.

3.3.2.1 Préparer la dilution initiale 1:10 dans de l'APW et les dilutions décimales subséquentes par multiple de 10 dans du PBS à pH de 7,2 à 7,5. Ensemencer les séries NPP de la façon décrite pour *V. parahaemolyticus* et incubé à 35 /C pendant 12 à 16 heures.

**Note :** Si l'enrichissement est à la fois pour *V. parahaemolyticus* et *V. Vulnificus*, utiliser du PBS à pH de 7,2 à 7,5 et un bouillon d'enrichissement APW.

### 3.4 .Ensemencement

3.4.1 Après l'incubation, **ne pas agiter** les tubes de culture.

3.4.2 Pour l'isolement de *V. parahaemolyticus*, examiner les tubes pour la présence de turbidité.

Ensemencer en stries toutes les dilutions qui présentent une turbidité visible ainsi que la dilution suivante la plus élevée (non turbide) en prenant une anse de culture dans la partie supérieure de

1 cm de chaque bouillon. Ensemencer en stries sur gélose au thiosulfate, au citrate et aux sels biliaires (TCBS).

3.4.3 Pour l'isolement de *V. vulnificus*, ensemencer en stries les bouillons sur la gélose Cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC) selon la technique décrite en 3.4.2.

3.4.4 Ensemencer en stries les cultures de contrôle APS/APW de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sur TCBS et mCPC.

3.4.5 Incuber les géloses TCBS à 35 /C et les géloses mCPC à 40 /C pendant 18 à 24 heures.

3.4.6 Optionnel:

*V. halles*

Utiliser la gélose au sang ou la gélose mannitol-maltose, incubé à 35 /C pendant 18 à 24 heures, pour détecter *V. halles*.

### 3.5. Identification

3.5.1. Examiner les géloses TCBS et mCPC pour des colonies typiques de *V. parahaemolyticus* et

*V. vulnificus*, ainsi que pour des caractéristiques d'autres *VIBRIO spp*.

3.5.1.1 Gélose au thiosulfate, au citrate, aux sels biliaires et au saccharose (TCBS):

Sur la gélose TCBS, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, et *V. Hervé* sont des colonies rondes vertes ou bleues d'un diamètre de 2 à 3 mm. Les colonies de *V.*

*alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae*, *V. metschnikovii*, et certains *V. vulnificus* sont plus larges et jaunes (acides suite à la fermentation du saccharose).

### 3.5.1.2 Gélose cellobiose-polymixine B-colistine modifiée (mCPC)

Sur la gélose mCPC, les colonies de *V. vulnificus* sont aplaties et jaunes (acides suite à la fermentation du cellobiose) avec des centres opaques et des pourtours transparents, d'un diamètre approximatif de 2 mm. Il s'agit d'une identification présomptive de *V. vulnificus*. Les non-fermenteurs de cellobiose, tels que *V. cholerae* EI Tor, apparaissent comme des colonies surélevées violettes ou vertes. *V. parahaemolyticus* croît rarement sur la gélose mCPC. D'autres espèces de *Vibrio* ne croissent pas facilement sur la gélose mCPC. Des Pseudomonases produisent des colonies pourpres ou vertes et sont fréquemment observées à de faibles dilutions de l'échantillon.

### 3.5.1.3 Gélose au sang

Inonder la plaque incubée pendant 18 à 24 heures avec le réactif pour l'épreuve de l'oxydase et choisir les colonies positives à l'oxydase (bleu foncé) (8.15). Parce que *V. hollisae* ne croît pas sur les géloses TCBS et mCPC, cette méthode non sélective peut isoler l'organisme. Toutefois, la sur croissance par d'autres bactéries peut constituer un problème.

### 3.5.1.4 Gélose mannitol-maltose

Sur ce milieu non sélectif, les colonies de *V. hollisae* sont rondes, brillantes et violettes (ne fermentent pas le mannitol ni le maltose), alors que d'autres *Vibrio* spp. sont jaunes (acides suite à la fermentation du mannitol et/ou du maltose). La sur croissance par d'autres bactéries peut constituer un problème.

3.5.2 Prélever 3 colonies ou plus qui sont typiques ou suspectes à partir de chaque milieu et ensemer en stries une gélose T1N2 (1 % de tryptone et 2 % de NaCl) ou une gélose trypticase soya (TSA) + 1,5 % de NaCl (concentration finale de 2 % de NaCl) pour isolement. Incuber de 18 à 24 heures à 35 /C.

### 3.5.3 Tolérance au sel : gélose gélatine (GA) et gélose gélatine avec 3 % de NaCl (GS)

À partir des mêmes colonies, tester pour la tolérance au sel en divisant les plaques de GA et de

GS en 8 secteurs. Ensemencer une ligne droite au centre d'un secteur de chacune des plaques de GA et GS avec chaque isolat. Incuber de 18 à 24 heures à 35 /C. *V. cholerae* et *V. mimicus* croîtront sur les deux plaques parce qu'ils ne requièrent pas de sel. Les *Vibrio* spp. Halophiles

croîtront seulement sur la plaque de GS. Pour lire la réaction à la gélatinase, tenir la plaque au-dessus d'une surface noire. Un halo opaque sera présent autour de la croissance des organismes positifs à la gélatinase. La plupart des *Vibrio* spp. sont positifs à la gélatinase.

### **3.5.4 Identification biochimique préliminaire :**

#### **3.5.4.1 Tests d'identification rapide**

Des galeries API 20E ou des trousse d'identification rapide équivalentes peuvent être utilisées comme solution de rechange aux milieux en tube traditionnel pour les tests biochimiques. Toutefois, certains *Vibrio* spp. ne croîtront pas dans les milieux des galeries de tests commerciales lorsque'une solution physiologique saline (0,85 % de NaCl) est utilisée comme diluant. Utiliser 2 % de NaCl comme diluant. Si les galeries commerciales ne permettent pas l'identification, continuer avec des tests traditionnels.

#### **3.5.4.2 Test de l'oxydase**

Se servir de la croissance sur la plaque de GS (ou autre milieu sans hydrates de carbone fermentables) pour le test de l'oxydase. Placer 2 ou 3 gouttes du réactif de l'oxydase sur la croissance bactérienne ou transférer une petite quantité de la croissance avec un cure-dent stérile ou une anse de platine ou jetable sur un papier filtre imbibé avec le réactif de l'oxydase. (Ne pas utiliser des anses de nickel chrome.) Une couleur bleu foncé apparaîtra rapidement (en moins de 2 minutes), ce qui dénote une réaction positive. *V. metschnikovii* est le seul *Vibrio* spp. halophile pathogène négatif à l'oxydase.

3.5.4.3 À partir des colonies isolées, inoculer le milieu du test de mobilité, l'AGS, la gélose aux trois sucres et au fer en pente (TSI). Ensemencer également le bouillon trypticase soja (TSB), la gélose en pente TSA et la plaque TSA, tous avec une concentration finale de 2 % de NaCl, requis pour les tests supplémentaires. Incuber pendant 18 à 24 heures à 35 /C. Consulter les divers tests des tableaux 2 et 3 pour l'identification.

#### **a) Milieu pour le test de mobilité**

Ensemencer l'inoculum en piqûre au centre et aux 2/3 de la profondeur du milieu du test de mobilité. Incuber de 18 à 24 heures à 35 /C. Une croissance bactérienne circulaire diffuse à partir de la ligne de piqûre est un test positif. *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et les *Vibrio* spp. connexes sont mobiles. Après 24 heures, bien fermer le tube et entreposer à 20 à 25 /C pour préserver la culture.

### **b) Gélose à l'arginine et au glucose en pente**

Ensemencer la pente en stries et le culot par piqûre de l'AGS. Incuber les tubes faiblement bouchés ou fermés pendant 18 à 24 heures à 35 /C. Les *Vibrio* spp. ne produisent pas de H<sub>2</sub>S ou de gaz. Les réactions typiques de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont une pente alcaline (violette) et un culot acide (jaune).

### **c) Gélose aux trois sucres et au fer en pente**

Ensemencer la pente en stries et le culot par piqûre de la gélose TSI. Incuber les tubes faiblement bouchés ou fermés pendant 18 à 24 heures à 35 /C. Les *Vibrio* spp. produisent un culot acide (jaune), mais ne produisent pas de gaz ou de H<sub>2</sub>S. *V. parahaemolyticus* produit une pente alcaline (rouge). *V. vulnificus* produit habituellement une pente alcaline (rouge).

Utiliser ce milieu ou un autre contenant du lactose comme source d'inoculum pour le test de l'ONPG.

#### **3.5.4.4 Sensibilité au vibriostat O/129**

Placer les disques qui contiennent 10 et 150 µg du composé vibriostatique O/129 sur une zone striée très dense d'une gélose TSA avec une concentration finale de 2 % de NaCl. Inverser les plaques et incuber pendant 18 à 24 heures à 35 /C. Les *Vibrio* spp. sont sensibles à 150 µg du composé O/129, mais certains sont résistants à 10 µg du composé O/129. Consulter le tableau 2 pour l'interprétation des résultats.

## **Résumé**

Les fruits de mer et leur environnement (eau de mer) constituent un risque majeur de toxi infections alimentaires et de maladies liées aux espèces de *Vibrio* dont les répercussions peuvent parfois devenir graves et mortelles pour le consommateur

200 échantillons de fruit de mer (170 crevettes, 20 moule, 10 crabes), provenant de la région de Jijel, Colo, Skikda, Annaba et El Kala ont été soumis à un double enrichissement dans du NaCl à 1% et 5% suivi d'un isolement sur gélose TCBS et une identification biochimique Sur galeries biochimiques API20E.

*Vibrio alginolyticus* a été isolé dans un échantillon de crevettes prélevé dans la région de Skikda au mois de mai soit une prévalence de 0,6%. Aucun *Vibrio* n'a été détecté dans les autres matrices.

D'autres espèces bactériennes ont été isolées sur la gélose TCBS à partir de 37,2% des échantillons de crevettes, de 75% des moules et dans sept prélèvements d'eau de mer. Ces bactéries non moins dangereuses pour la santé publique sont par ordre décroissant : *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas Pseudomallei*, *Aeromonas Hydrophila*, *Proteus Vulgaris* et *Staphylococcus*.

La prévalence de *Vibrio* enregistrée au cours de cette étude est inférieure à celles observées en Grande Bretagne, en France, en Croatie, aux Pays Bas, en Norvège et en Italie et supérieure à celle de la Belgique où aucun *Vibrio* n'a été isolé à partir des produits de la mer. Ceci nous mène à recommander le développement de méthodes de recherche plus adaptées et des mesures préventives pour minimiser le risque des contaminations biologiques dans les produits de la mer.

**Mot clés :** *Vibrios spp.*, *Vibrios alginolyticus*, prévalence, fruits de mer, eau de mer, contamination bactérienne.

## **Abstract**

Seafood and their environment (seawater) constitute a major risk of foodborne diseases that are related to *Vibrio* species whose repercussions may become sometimes serious and fatal for the consumer.

200 samples of seafood (170 shrimp, 20 mould, 10 crabs) from the region of Jijel, Colo., Skikda, Annaba and El Kala have been subjected to a double enrichment in NaCl 1% and 5% followed by an isolation in TCBS agar and a biochemical identification on API20E biochemical galleries.

*Vibrio alginolyticus* was isolated in a sample of shrimp taken from the region of Skikda in May with a prevalence of 0.6%. No *Vibrio* has been detected in other matrices.

Other species of bacteria were isolated on the TCBS agar from 37.2% of the shrimp's samples, 75% of the mussels' samples and seven samples of seawater. These bacteria not less dangerous to public health are, in decreasing order: *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas Pseudomallei*, *Aeromonas Hydrophila*, *Proteus Vulgaris* and *Staphylococcus*.

The prevalence of *Vibrio* recorded during this study is lower than those seen in Britain, France, Croatia, Netherlands, Norway and Italy and higher than that of Belgium where no *Vibrio* has been isolated from seafood products. This leads us to recommend the development of research methods and more appropriate preventive measures to minimize the risk of biological contamination in seafood

**Keywords:** *Vibrios spp.*, *Vibrios alginolyticus*, prevalence, seafood, seawater, bacterial contamination.

## المخلص

المأ كولات البحرية وبيئتها(ماء البحر ) قد تشكل خطر كبير يؤدي لتسمم الغذائي والامراض المتعلقة بانواع *Vibrio* والتي تكون لها تاثيرات احيانا تصبح خطيرة ومميتة للمستهلك. عينة من الاطعمة البحرية (170 جمبري، 20 قالب , 10 سرطان) مأخوذة من منطقة جيجل، القل ، سكيكدة ، عنابة والقالة، تم احصائها باثراء المضاعف في حمض كلور الماء بنسبة 1% و 5% المتبوع بعزل فوق

API 20E وتحديد بيوكيميائي في أنفاق Gelose TCBS  
*Vibrio alginolyticus* تم عزلها من عينة جنبري اخذت من منطقة سكيكدة في شهر ماي ،  
بحيث ان نسبة اثرها كانت 0.6 %، لم يتم الكشف على *Vibrio* في  
الصفوفات

أكتشفت انواع اخرى من بيكتريا تم عزلها ابتداء من 37.2% من عينات الجمبري، 75% من عينات القالب وفي سبع  
عينات من ماء البحر هذه البيكتريا التي لا تقل خطورة على الصحة العمومية هي بالترييب  
التنازلي: *Pseudomonas, citobacter, Aeromonas, Proteus*

اثر *oirbiv* المسجل من خلال هذه الدراسة اقل من ذلك الملاحظ في انجليترا ، فرنسا ، كرواتيا، هولندا النرويج وايطاليا  
واكثر من ذلك المسجل في بلجيكا التي لم يتم عزل أي *Voirbi* في الاطعمة البحرية.  
هذا يقودنا لتوصية وجوب تطوير طرق البحث الاكثر الملائمة واتخاذ تدابير وقائية للتقليل الى ادنى حد خطر التلوث  
البيولوجي الناجم من الاطعمة البحرية .

**الكلمات الرئيسية:** مأكولات بحرية ، مياه البحر، تلوث الجرثومي، *Vibrio*  
*Vibrio alginolyticus*