

UNIVERSITE DE BLIDA-1

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

THESE DE DOCTORAT

en Sciences Vétérinaires

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RECHERCHE DES ESPECES DE *VIBRIO*
POTENTIELLEMENT PATHOGENES CHEZ LE LOUP DE MER ET LA
DAURADE ROYALE DANS LA WILAYA DE BOUMERDES.

Par

Sonia ARAB

Devant le jury composé de :

DJ. BAAZIZE - AMMI	M.C.A, ISV - Université. Blida 1	Présidente
M. AKKOU	M.C.A, ISV - Université. Blida 1	Examineur
L. BOUAYAD	M.C.A, ENSV. ALGER	Examinatrice
M.HAMIROUNE	M.C.A, Université de DJELFA	Examineur
K. HARHOURA	Professeur, ENSV. ALGER	Examineur
A. BERBER	Professeur, ISV - Université. Blida 1	Directeur de thèse

Blida, Octobre 2020

RESUME

Certaines espèces du genre *Vibrio* sont à l'origine de maladies infectieuses chez l'homme par la consommation de produits de mer crus ou insuffisamment cuits, ce qui représente un problème de santé publique. Les épisodes d'infections à *Vibrio* sont généralement associés à des symptômes gastro-intestinaux aigus, à une septicémie et à des lésions des tissus mous, avec une issue différente selon les souches impliquées et la sensibilité de l'hôte. Les infections cholériques et non cholériques sont les deux principales maladies causées par les souches pathogènes de *Vibrio*. Les sérogroupes O1 et O139 du *Vibrio* cholériques sont les agents étiologiques du choléra qui est une maladie infectieuse humaine avec une tendance potentiellement épidémique caractérisée par des épisodes massifs de diarrhée aiguë, mettant la vie en danger, en particulier pour les sujets non traités.

Malgré ces risques potentiels, peu d'études ont été réalisées dans notre pays afin de mieux estimer la prévalence des *vibrions* pathogènes dans les produits de la pêche. De telles études sont importantes parce qu'elles permettent d'évaluer les risques dû à ces pathogènes et la mise en place des mesures préventives pour la maîtrise des dangers sanitaires liés à la consommation des produits de la pêche. C'est dans ce sens que s'inscrit la présente étude qui se fixe comme objectif d'évaluer la prévalence de pathogènes émergents de type *vibrions* dans les produits de la mer en Algérie.

L'étude a été menée dans une région centre de la côte algérienne, sur une période de trois ans. Un total de 690 échantillons de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) et de la dorade royale (*Sparus aurata*) d'élevage et sauvage ont été prélevés mensuellement de janvier 2017 à décembre 2018 au niveau de trois zones de production halieutique, à savoir, la zone de Boumerdes, Azeffoun et Tipaza ; et 280 échantillons de mollusques bivalves (*Mytilus galloprovincialis*) ont été collectés de façon aléatoire et simple à partir de six sites de la côte algérienne, dont trois sites conchylicoles (la ferme conchylicole de Ain Taya, la ferme de Ain taghoureit et la ferme de d'Oued Goussine) et trois sites sauvages (moulières d'Oued Goussine, moulières du Vivier de Bou-Ismaïl et la moulières tonic de Tipaza) sur une période d'une année (du janvier au décembre 2018).

Les analyses microbiologiques ont été effectuées selon la norme ISO / TS 21872-1 : 2007, pour *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* et selon la norme ISO / TS 21872-2 : 2007, pour la détection d'autres espèces de *Vibrio*. L'identification microbiologique est basée sur les techniques bactériologiques classiques (examens macroscopiques, microscopiques, API20^E), MALDI-TOF MS, Techniques immunologiques (sérotypage de *V. cholerae*), et les techniques moléculaires (PCR).

Les résultats de cette étude ont révélé 42 souches isolées de *Vibrio* spp soit une prévalence globale de 6,08 % à partir de la flore viscérale et branchiale du loup de mer et de la dorade royale d'élevage, à savoir 15 isolats de *V. cholerae*, 5 isolats de *V. fluvialis*, 20 souches de *V. alginolyticus* et 2 isolats de *V. hollisae*, alors qu'aucun *Vibrio* n'a été détecté chez les poissons sauvages et 51 souches de *vibrio* ont été isolées chez les moules, soit une prévalence globale de 12,1%, dont 33 isolats de *V. cholerae* (avec une prévalence de 11,8%) et 18 isolats de *V. fluvialis* (avec une prévalence de 6,4 %) ; Le gène de la toxine cholérique (*ctxA*) était présent dans un seul échantillon de moule.

Ces résultats révèlent que les produits de la mer peuvent présenter un danger potentiel pour la sécurité du consommateur en Algérie et soulignent l'importance du contrôle de ces espèces.

Mots clés : *Vibrio*, pathogènes, *Dicentrarchus labrax*, *sparus aurata*, *Mytilus galloprovincialis*, PCR, Algérie.

SUMMARY

Certain species of the genus *Vibrio* cause infectious diseases in humans through the consumption of raw or undercooked seafood, which is a public health problem. Episodes of *Vibrio* infections are usually associated with acute gastrointestinal symptoms, septicaemia and soft tissue damage, with outcomes differing according to the strains involved and the susceptibility of the host. Cholera and non-cholera infections are the two main diseases caused by pathogenic strains of *Vibrio*. Serogroups O1 and O139 of cholera *Vibrio* are the etiological agents of cholera, which is an infectious human disease with a potentially epidemic tendency characterized by massive episodes of acute, life-threatening diarrhea, especially for untreated subjects.

Despite these potential risks, few studies have been carried out in our country to better estimate the prevalence of pathogenic *vibrios* in fish products. Such studies are important because they make it possible to assess the risks due to these pathogens and the implementation of preventive measures for the control of health hazards related to the consumption of fishery products. It is in this sense that the present study, which aims to assess the prevalence of emerging pathogens of the *vibrio* type in seafood products in Algeria, is part of this process.

The study was carried out in a central region of the Algerian coast, over a period of two years in fish and one year in mussels. A total of 690 samples of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*), both farmed and wild, were taken monthly from January 2017 to December 2018 in three fish production areas, namely Boumerdes, Azeffoun and Tipaza; and 280 samples of bivalve molluscs (*Mytilus galloprovincialis*) were collected randomly and simply from six sites on the Algerian Mediterranean coast, including three shellfish farming sites (The shellfish farm of Ain Taya, the farm of Ain taghoureit and the farm of Oued Goussine) and three wild sites (Oued Goussine's mussels, the Vivier de Bou-Ismaïl's mussels and Tipaza's tonic mussels) over a period of one year (from January to December 2018).

Microbiological analyses were carried out according to the ISO / TS 21872-1: 2007 standard for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* and according to the ISO / TS 21872-2: 2007 standard for the detection of other *Vibrio* species. Microbiological identification is based on classical bacteriological techniques (macroscopic and microscopic examinations, API20E), MALDI-TOF MS, immunological techniques (serotyping of *V. cholerae*), and molecular techniques (PCR).

The results of this study revealed that we were able to isolate 42 strains of *Vibrio* spp (with an overall prevalence of 6.08%) from the visceral and gill flora of sea bass and farmed gilthead sea bream, namely 15 isolates of *V. cholerae*, 5 isolates of *V. fluvialis*, 20 strains of *V. alginolyticus* and 2 isolates of *V. hollisae*, while no *Vibrio* was detected in wild fish; while in mussels, 51 isolates of *Vibrio* were isolated, with an overall prevalence of 12.1%, including 33 isolates of *V. cholerae* (with a prevalence of 11.8%) and 18 isolates of *V. fluvialis* (with a prevalence of 6.4%); the gene for cholera toxin (*ctxA*) was present in a single mussel sample.

These results reveal that seafood products may present a potential danger to consumer safety in Algeria and underline the importance of controlling these species.

Keywords: *Vibrio* , pathogens, *Dicentrarchus labrax*, *sparus aurata*, *Mytilus galloprovincialis*, PCR, Algeria.

ملخص

بعض الأنواع من جنس *Vibrio* تسبب أمراضًا معدية للإنسان من خلال تناول المأكولات البحرية النيئة أو غير المطهية جيدًا ، وهي مشكلة صحية عامة .عادة ما ترتبط بأعراض الجهاز الهضمي الحادة ، والإنتان ، وتلف الأنسجة الرخوة ، مع نتائج مختلفة اعتمادًا على السلالات المعنية وقابلية المضيف للإصابة .عدوى الكوليرا وغير الكوليرا هما المرضان الرئيسيان اللذان تسببهما السلالات المسببة للأمراض من الضمات .إن مجموعتي الكوليرا *Vibrio O1* و *O139* هما العاملان المسببان للكوليرا وهو مرض بشري معدي يمكن أن يتحول إلى وبائي يتميز بنوبات ضخمة من الإسهال الحاد الذي يهدد الحياة ، لا سيما في الأشخاص غير المعالجين.

على الرغم من هذه المخاطر المحتملة ، تم إجراء عدد قليل من الدراسات في بلدنا لتقدير انتشار الضمات المسببة للأمراض في منتجات مصايد الأسماك بشكل أفضل .هذه الدراسات مهمة لأنها تجعل من الممكن تقييم المخاطر الناجمة عن هذه العوامل الممرضة وتنفيذ التدابير الوقائية للسيطرة على المخاطر الصحية المرتبطة باستهلاك المنتجات السمكية . وبهذا المعنى فإن هذه الدراسة جزء من هدف تقييم انتشار مسببات الأمراض الناشئة مثل *Vibrio spp* في المأكولات البحرية في الجزائر.

أجريت الدراسة في منطقة وسط الساحل الجزائري على مدى عامين في الأسماك و في بلح البحر .تم جمع ما مجموعه 690 عينة من أسماك القاروص (*Dicentrarchus labrax*) والدينيس (*Sparus aurata*) المستزرعة والبرية شهرًا من يناير 2017 إلى ديسمبر 2018 في ثلاث مناطق إنتاج سمكي ، وهي بومرداس وأزفون وتيبازة ؛ و 280 عينة من الرخويات ذات الصدفتين (*Mytilus galloprovincialis*) تم جمعها بطريقة عشوائية وبسيطة من ستة مواقع على ساحل البحر الأبيض المتوسط الجزائري ، بما في ذلك ثلاثة مواقع لمزرعة المحاريات) مزرعة عين تايا للمحار ، مزرعة عين تاغوريت ووادي القصسين (وثلاثة مواقع برية) في واد القصين ، بو سماعيل و تيبازة، على مدار عام واحد (من يناير إلى ديسمبر 2018) .

تم إجراء التحاليل الميكروبيولوجية وفقًا للمواصفة 2007 : ISO / TS 21872-1 ، لضمة *Vibrio cholerae* و *sparahaemolyticus* ووفقًا للمواصفة 2007 : ISO / TS 21872-2 ، للكشف عن أنواع الضمة الأخرى .يعتمد التحديد الميكروبيولوجي على التقنيات البكتريولوجية التقليدية ، المجهرية ، (API20E) ، MALDI-TOF MS ، التقنيات المناعية) التنميط المصلي لضمة الكوليرا ، والتقنيات الجزيئية.(PCR)

أوضحت نتائج هذه الدراسة أنه تمكنا من عزل 42 سلالة من *Vibrio spp* بمعدل انتشار كلي 6.08 ، وهي 15 عزلة من *vibrio* الكوليرا ، 5 عزلات لـ *V. fluvialis* ، 20 عزلة من *V. alginolyticus* و 2 عزلات من *V. hollisae* ، بينما لم يتم اكتشاف *Vibrio* في الأسماك البرية ؛ بينما في بلح البحر ، تم عزل 51 عزلة من الضمة بنسبة انتشار إجمالية قدرها 12.1% ، بما في ذلك 33 عزلة من ضمة الكوليرا) مع انتشار 11.8% (و 18 عزلة من *vibrio* الكوليرا) بنسبة انتشار 6.4% ؛ (كان جين الكوليرا (ctxA) موجودًا في عينة بلح البحر الواحدة.

تكشف هذه النتائج أن المأكولات البحرية يمكن أن تشكل خطراً محتملاً على سلامة المستهلك في الجزائر وتؤكد على أهمية السيطرة على هذه الأنواع .

الكلمات المفتاحية: *Vibrio* ، مسببات الأمراض ، *Dicentrarchus labrax* ، *sparus* ،
PCR ، *Mytilus galloprovincialis* ، *aurata* ، الجزائر

REMERCIEMENTS

A Madame BAAZIZE-AMMI Djamila

Maître de conférences A, à l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université BLIDA-1
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse
Hommage respectueux.

A Mon directeur de thèse Monsieur BERBERE Ali

Professeur, à l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université BLIDA-1
Pour son aide précieuse ;
Sincère reconnaissance.

A Mon Co-directeur de thèse Monsieur GIARRATANA Filippo

Maître de conférences A, Université de Messine, Italie
Qui m'a beaucoup apporté, autant scientifiquement que professionnellement et
humainement.

A Monsieur AKKOU Madjid

Maître de conférences A, à l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université BLIDA-1
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse ;
Sincères remerciements.

A Madame BOUAYAD Leila

Maître de conférences A, à l'Ecole Nationale Vétérinaire Supérieure d'Alger
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse ;
Sincères remerciements.

A Monsieur HAMIROUNE Mourad

Maître de conférences A, à l'université de Djelfa
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse ;
Sincères remerciements.

A Monsieur HARHOURA Khaled

Professeur, à l'Ecole Nationale Vétérinaire Supérieure d'Alger
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse ;
Sincères remerciements.

Je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire de l'intendance EL HARACHE, pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur qui m'ont permis d'effectuer mon stage dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie également tous les membres de l'équipe du laboratoire d'analyse microbiologique des aliment d'origine animale de l'université de Degli Studi Di Messina Dipartimento Di Scienze Veterinarie Italia :Filly Lamberta, Stefania Maria Marotta, Luca et Graziella Ziino, Pour leur aide, gentillesse, disponibilité, bonté et générosité.

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

L'éternel des armées :

Créateur du ciel et de la terre, celui qui fait sortir le pain de la terre et l'eau du rocher, par qui tout est possible, à qui je demande de me donner la sagesse de concevoir tout ce qui est juste et bon, la volonté de l'accomplir et la force de le défendre en tout lieu et en toute circonstance.

À mon père (*in memorium*):

Ce travail est le résultat des sacrifices que vous avez consentis pour moi. Homme de travail et de volonté, vous m'avez toujours inspiré la droiture, la franchise et le respect du prochain.

J'espère que, Allah l'accueille en son vaste paradis.

Papa Arab Ali.

À ma mère:

Je ne saurais traduire en termes réels l'émotion que Je ressens quand je tente de répertorier tout ce que vous avez fait pour nous.

Ce travail est l'expression de ma reconnaissance et du grand respect que j'ai pour vous.

À mon mari :

Votre compréhension, votre participation morale sont à la base de ce travail.

À mon fils (Aksim), mon frère (Aghiles), ma sœur (Lyna) et à toute ma famille.

Merci de m'avoir toujours soutenu.

À mes chers amis :

Dihia, kahina, Linda, Nadia, Asma, Amina, Sofian, Laid, Bachir, Imen, shahrazed, Lyes, Hanane, Wissem, Hamza, Leila, Ferdaous, Horia, Ryma, Samia.

TABLE DES MATIERES

RESUME	01
REMERCIEMENTS	07
TABLE DES MATIERES	10
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	12
INTRODUCTION	17
LA PARTIR BIBLIOGRAPHIQUE	20

CHAPITRE 1 : LES BACTERIES DU GENRE *VIBRIO*

1.1. Introduction	20
1.2. Historique	20
1.3. Caractéristiques taxonomiques, phénotypiques et écologiques	22
1.3.1. Taxonomie	22
1.3.2. Caractéristiques phénotypiques	26
1.3.3. Structure du génome	28
1.3.4. Caractéristiques écologiques	29
1.4. Pouvoir pathogène	29
1.4.1. Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes chez l'homme	30
1.4.2. Les <i>vibrions</i> pathogènes des organismes marins	33
1.5. <i>Les facteurs de virulence du genre Vibrio</i>	39
1.5.1. La notion de virulence chez les bactéries	39
1.5.2. Plasticité génomique	41
1.5.3. Les mécanismes de virulence des <i>Vibrio</i>	43
1.6. Méthodes de détection du genre <i>Vibrio</i>	63

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

2.1. INTRODUCTION	65
2.2. La recherche des <i>vibrio dans</i> les poissons	66
2.2.1. Description des sites d'étude	66
2.2.2. Matériel et méthodes	69
2.2.2.1. Matériel	69

2.2.2.2. Echantillonnage	69
2.2.2.3. Méthodes	71
2.2.3 Résultats	77
2.2.4. Discussion	86
2.2.5 Conclusion	94
2.3. LA RECHERCHE DES <i>VIBRIO</i> DANS LES MOULES	96
2.3.1. Matériel	96
2.3.2. Méthodes	97
2.3.3. Résultats	98
2.3.4. Discussion	103
2.3.5. Conclusion	106
Conclusion Générale	107
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	108
REFERENCES	110
A. LISTE DES ABREVIATIONS	157
B. MATERIEL DE LABORATOIRE	159

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

A. Liste des figures

Figure 1.1	Résolution taxonomique des outils de typage les plus couramment utilisés.	24
Figure 1.2	Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences : ARNr 16S, recA et rpoA (2,898 bp), mettant en évidence différents groupes de <i>Vibrio</i> .	25
Figure 1.3	Arbre phylogénétique fondé sur le séquençage de huit gènes de référence (gapA, gyrB, ftsZ, mreB, pyrH, recA, rpoA, et topA) des 96 espèces de <i>Vibrio</i> .	26
Figure 1.4	Micrographie de <i>Vibrio pectenicida</i> souche A365T sur milieu solide montrant les flagelles polaires et latéraux (x14000) obtenue en microscopie électronique à transmission.	27
Figure 1.5	Diversité phénotypique de deux souches appartenant au groupe <i>Vibrio</i> sur le milieu TCBS.	28
Figure 1.6	Modèle des facteurs environnementaux impliqués dans la transmission du cholera.	32
Figure 1.7	Dynamique des génomes bactériens.	41
Figure 1.8	Les trois grands mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries	42
Figure 1.9	Flagelle polaire unique chez <i>V. cholerae</i> , B. Flagelles multiples chez <i>V. fisheri</i> et C. Flagelles latéraux multiples chez <i>V. parahaemolyticus</i> .	44
Figure 1.10	Ultrastructure du flagelle bactérien de bactérie Gram négatif	45

Figure 1.11	Description du rôle du TCP (Toxin coregulated pilus) de <i>V. cholerae</i> , un exemple de pilus de type IV	47
Figure 1.12	Mécanismes d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négatif	51
Figure 1.13	Mode d'action de la toxine cholérique CT	54
Figure 1.14	Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SSTT)	56
Figure 1.15	Structure des LPS et de la capsule des sérogroupes O1 et O139 de <i>V. cholerae</i> . Le lipide A et le core sont identiques pour les deux sérogroupes. Les quelques différences chimiques sont indiquées par « ? »	58
Figure 1.16	Le phénomène de la formation de CEVC et leur ressuscitation chez <i>V. cholerae</i>	61
Figure 1.17	Impact du quorum sensing sur l'expression des facteurs de virulence chez <i>V. harveyi</i>	62
Figure 2.1	Localisation géographique de la ferme de cap djinet. (Google earth, 2019).	66
Figure 2.2	Localisation géographique de la Ferme de Zemmouri El Bahri. (Google earth, 2019).	67
Figure 2.3	Localisation géographique de la ferme de M'LATA, Azzefoune. (Google earth, 2019).	68
Figure 2.4	Localisation géographique de la ferme aquacole de Ain Tagourait. (Google earth, 2019).	68
Figure 2.5	Le pourcentage d'isolement des vibriions dans l'ensemble des poissons analysés.	78

Figure 2.6	Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>rpoA</i> (242 pb) des isolats de <i>Vibrio</i> isolées.	79
Figure 2.7	Résultats d'isolement des vibrions chez le loup de mer et la dorade royale.	81
Figure 2.8	Répartition des <i>Vibrio</i> en fonction des sites de prélèvement.	82
Figure 2.9	Répartition des <i>Vibrio</i> en fonction de la saison de d'échantillonnage.	84
Figure 2.10	Localisation de la zone d'échantillonnage le long de la côte algérienne.	97
Figure 2.11	Electrophorèse sur gel d'agarose du produit d'amplification des isolats de <i>Vibrio</i> isolés obtenus par PCR classique.	100
Figure 2.12	Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>prVC</i> (300 pb) des souches de <i>Vibrio cholerae</i> isolées.	100
Figure 2.13	Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>ctxA</i> (505 pb) de la souche de <i>Vibrio cholerae</i> O1.	101

B. Liste des tableaux

Tableau 1.1	Association des espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes avec les syndromes cliniques	30
Tableau 1.2	Espèce de <i>Vibrio</i> pathogène de poissons	35
Tableau 1.3	Exemples d'espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes pour les mollusques bivalves	37
Tableau 1.4	Rôle biologiques de métalloprotéases décrites chez le genre <i>Vibrio</i>	49
Tableau 1.5	Différents sidérophores décrits au sein du genre <i>Vibrio</i>	52
Tableau 2.1	répartition des échantillons de loup de mer (<i>Dicentrarchus labrax</i>) d'élevage et sauvage en fonction des sites de prélèvement.	70
Tableau 2.2	Répartition des échantillons de loup de mer (<i>Dicentrarchus labrax</i>) d'élevage et sauvage collectés mensuellement de janvier 2017 à décembre 2018	70
Tableau 2.3	Répartition des échantillons de la dorade royale (<i>Sparus.aurata</i>) d'élevage et sauvage collectés mensuellement de janvier 2017 à décembre 2018	71
Tableau 2.4	Les résultats d'ensemencement des espèces du genre <i>vibrio</i> dans des galeries de croissance en sel	73
Tableau 2.5	Séquences des amorces utilisées dans notre étude pour la détection des <i>vibrions</i>	77
Tableau 2.6	Les caractères biochimiques des <i>vibrions</i> isolés sur les galeries API 20 ^E	78
Tableau 2.7	Les résultats de prévalence des <i>vibrions</i> chez le loup de mer et la dorade royale	80

Tableau 2.8	Résultats de répartition des isolats de Vibrions isolées en fonction de la saison de prélèvement	83
Tableau 2.9	Résultats du test d'ANOVA entre les espèces de <i>vibrio</i> isolées et la saison d'échantillonnage	85
Tableau 2.10	Résultats du test d'ANOVA entre les espèces de <i>vibrio</i> isolées et les sites de prélèvement	85
Tableau 2.11	Résultats du test de student entre les espèces de <i>vibrio</i> isolées et l'espèce de poisson analysée	85
Tableau 2.12	Répartition des échantillons de moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) d'élevage et sauvage collectés mensuellement de janvier 2018 à décembre 2018	97
Tableau 2.13	Les résultats globaux de l'identification microbiologiques des <i>vibrions</i> isolés	99
Tableau 2.14	Distribution des différentes souches de <i>Vibrio</i> isolées dans le <i>M. galloprovincialis</i> sauvage dans les sites 5 et 6 de janvier à décembre 2018	102
Tableau 2.15	distribution des souches de <i>Vibrio</i> isolées dans le <i>M. galloprovincialis</i> en fonction de type de moule analysé et le site d'échantillonnage	102

INTRODUCTION

Dans de nombreuses régions du monde, les produits de la pêche font partie du régime alimentaire des populations et constituent une importante source de protéines alimentaires. Cependant, ces produits sont pêchés dans des eaux de surface devenues vectrices et réceptrices de toute sorte de polluants [1].

Selon le lieu de pêche, il est possible qu'un nombre de germes pathogènes puissent contaminer ces produits et exposer les consommateurs à des risques sanitaires impactant leur santé. Ces germes induisent des problèmes d'ordre hygiénique toxicologique et économique [2].

Les bactéries appartenant au genre *Vibrio* sont des espèces endémiques du milieu marin et estuarien ; représentant une des fractions les plus abondantes des communautés microbiennes marines [3]. Elles ont été isolées à partir de plantes aquatiques, d'algues, de zooplancton et dans d'autres organismes marins [4]. Les *Vibrio* spp se développent généralement dans l'eau salée chaude. Elles ont également été isolées dans l'eau douce [5].

Certains *Vibrio* spp sont à l'origine de maladies infectieuses chez l'homme par la consommation de produits de mer crus ou insuffisamment cuits, ce qui représente un problème de santé publique [6], [7]. Les épisodes d'infections à *Vibrio* sont généralement associés à des symptômes gastro-intestinaux aigus, à une septicémie et à des lésions des tissus mous, avec une issue différente selon les souches impliquées et la sensibilité de l'hôte [8]. Les infections cholériques et non cholériques sont les deux principales maladies causées par les souches pathogènes de *Vibrio* [9], [10]. Les sérogroupes O1 et O139 du *Vibrio* cholériques sont les agents étiologiques du choléra qui est une maladie infectieuse humaine avec une tendance potentiellement épidémique caractérisée par des épisodes massifs de diarrhée aiguë, mettant la vie en danger, en particulier pour les sujets non traités [11]. Les sérogroupes de *Vibrio* non cholérique peuvent déterminer de nombreux syndromes associés à différentes manifestations cliniques [8], [12], [13]. Parmi ces derniers, nous avons :

- *Vibrio vulnificus* qui peut provoquer une bactériémie secondaire grave par l'exposition des plaies cutanées à de l'eau contaminée.

- *Vibrio alginolyticus* pouvant provoquer une infection des tissus mous et du sang [14].
- *Vibrio parahaemolyticus* est considéré comme le principal responsable de la gastro-entérite humaine qui provient de bactéries aquatiques [15].

En outre, de nombreux autres *Vibrio spp* provoquent certaines maladies animales ayant des conséquences économiques importantes pour l'industrie aquacole mondiale [16]. *V. aguilorum* et *V. alginolyticus* sont, en fait, signalés comme pathogènes pour plusieurs poissons et crustacés [17], [18], [19]. *V. alginolyticus* est responsable de nombreuses épizooties chez les deux poissons les plus importants de l'aquaculture méditerranéenne, à savoir la daurade royale (*Sparus aurata*) et le bar (*Dicentrarchus labrax*) [20], [21], [22].

En Algérie (août 2018), on a signalé 74 cas de choléra confirmés dans six régions du nord et du littoral du pays, dans les zones rurales et urbaines [23].

L'épidémie a pour cause le mauvais assainissement et le manque d'eau potable. Malgré ce risque potentiel, aucune étude n'a été menée en Algérie sur l'impact de cette épidémie sur la contamination microbiologiques des produits de la mer par *Vibrio cholerae*.

Dans l'état actuel des choses, l'impact global des infections à *Vibrio spp* dans le monde est mal cerné en raison de l'absence d'un système de surveillance coordonné au niveau international. Dans les pays en développement, certaines souches pathogènes de *Vibrio* représentent une préoccupation majeure de la part des pouvoirs de santé publique [8].

A cet effet, nous nous sommes penchés sur ce problème afin d'évaluer la présence des *vibrions* chez les produits de la mer (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* et *Mytilus galloprovincialis*) sauvage et d'élevage, le long de la côte algérienne.

Les parties concernant cette étude sont :

- Une synthèse bibliographique où nous donnons quelques généralités sur le genre *vibrio* et les conséquences qui en découlent sur la santé de l'homme et l'animal.
- Les techniques et méthodes mis en œuvre pour identifier les *vibrions* isolés à partir de produits de la mer.

- Interprétation et discussion des résultats obtenus pour évaluer la qualité hygiénique de ces produits et leurs distributions en fonction de la saison et le type de produit analysé (sauvage ou d'élevage).

CHAPITRE 1

Les bactéries du genre *Vibrio*

1.1. Introduction

L'étude des *Vibrio* affectant les espèces aquacoles et de leurs mécanismes de virulence a bénéficié en premier lieu des connaissances issues des nombreuses recherches menées sur les bactéries du genre *Vibrio* présentant un caractère pathogène chez l'homme. L'espèce la plus étudiée est *V. cholerae*, l'agent étiologique du choléra représentant encore aujourd'hui une menace sérieuse dans les pays où l'accès à de l'eau potable de bonne qualité reste un problème. Décrite en 1854 par l'italien PACINI, *V. cholerae* fut la première bactérie du genre *Vibrio* à être étudiée [24]. Les travaux de PACINI ont été approfondis par KOCH quelques années plus tard (1883-1884) et les recherches ne cessent, sur ses origines, son évolution, sa virulence. *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* responsables de toxi-infection alimentaire restent également très étudiés en raison de leur impact non négligeable en santé publique [25].

Au milieu du XXème siècle, les microbiologistes marins ont observé la prédominance du genre *Vibrio* sur les cultures bactériennes issues d'échantillons d'eau de mer ou associées à des poissons ou des coquillages [26], [27]. Puis des cas de *vibrioses* entraînant de lourdes pertes économiques ont émergé dans les élevages aquacoles et les *Vibrio* sont devenus l'objet d'une attention croissante et d'une préoccupation majeure pour l'aquaculture mondiale.

1.2. Historique

Historiquement, le rôle des *vibrio* en pathologie humaine a été reconnu en raison du fait que l'un d'entre eux, *Vibrio cholerae*, est à l'origine d'un des fléaux de l'humanité depuis les temps anciens, le choléra, qui reste une maladie d'importance mondiale. Elle a été reconnue en 1817 lorsqu'elle s'est étendue depuis le subcontinent indien au Moyen-Orient et à l'est de l'Afrique jusqu'en 1823. La deuxième pandémie envahit, de 1829 à 1851, l'Asie, le Moyen-Orient, l'Europe, l'Afrique et l'Amérique du Nord. La troisième pandémie qui s'est déroulée de 1852 à 1859, outre les régions déjà

touchées, atteignit aussi l'Amérique latine. La progression plus rapide de cette troisième pandémie est liée à l'apparition de la propulsion à vapeur utilisée pour les trains et les bateaux. La quatrième pandémie, de 1863 à 1879, bénéficia de l'ouverture du canal de Suez pour faciliter sa progression. La cinquième pandémie qui se déroula de 1881 à 1896 et envahit tous les continents sauf l'Australie, fut marquée par la découverte de l'agent responsable du choléra, le *vibrion* cholérique par Robert KOCH en 1883 et 1884. La sixième pandémie envahit l'Asie, le Moyen-Orient, et l'est de l'Europe en 1899 et 1923. Elle n'atteignit pas les pays d'Europe de l'Ouest et d'Amérique qui avaient commencé à élever leur niveau d'hygiène. *Vibrio cholerae* a été la première espèce du genre *Vibrio* à être décrite par PACINI en 1854, mais c'est KOCH qui démontre en 1884 que ce germe est bien à l'origine du choléra [24].

Ce n'est qu'en 1951 qu'une nouvelle espèce de *Vibrio* pathogène pour l'homme est identifiée. Cet organisme a été isolé des selles de patients victimes d'une intoxication alimentaire à Osaka au Japon ainsi que de l'aliment suspect : une sardine partiellement séchée appelée « Shirasu ». A l'origine, il a été placé dans le genre *Pasteurella* ; son nom actuel : *Vibrio parahaemolyticus* a été établi par SAKAZAKI et al; 1963 [25].

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

A partir du 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. L'agent isolé a été dans un premier temps confondu avec *Vibrio parahaemolyticus* ou appelé *vibrion* non-cholérique. Reconnu comme étant une nouvelle espèce par MAURIN en 1976 [28], les microbiologistes ont proposé de placer cet organisme dans le Genre *Beneckea* et de lui donner le nom d'espèce *vulnificus* pour « blessure » en latin. En 1979, FARMER a suggéré que cette bactérie soit placée dans le genre *Vibrio*, beaucoup de microbiologistes ayant contesté cette précédente classification, et en 1980, l'organisme a pris pour nom officiel *Vibrio vulnificus*.

Plus tard, des formes moins graves de choléra associées à des vibrions très similaires à la bactérie cholérique ont été reconnues. Ces organismes ne possédant pas l'antigène O1 caractéristique de *V. cholerae* sont aujourd'hui identifiés comme *V.*

cholerae non O1 ou NAG pour Non Agglutinating *Vibrio* ou encore NCV pour Non Cholera *Vibrio* [29].

En 1992, une nouvelle souche de choléra, incapable de provoquer l'agglutination avec l'antisérum O1, mais produisant une toxine cholérique, a été découverte au Bangladesh et en Inde et reconnue comme étant l'agent en cause dans un cas typique de choléra. Le sérotype a été décrit comme appartenant au nouveau séro groupe O139 en 1993. Aussi distingue-t-on aujourd'hui parmi l'espèce *Vibrio cholerae*, d'une part les souches appelées « vibrions cholériques » à savoir les sérogroupes O1 et O139 responsables du choléra, et d'autre part, les souches *Vibrio cholerae non O1* et non O139, isolées dans des cas de gastro-entérites mais aussi d'infections de tissus mous et de septicémies chez des sujets immunodéprimés [24].

D'autres espèces sont considérées comme pathogènes pour l'homme : *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* ont été isolés de cas de gastro-entérites ; *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis* et *V. damsela* ont été mis en cause dans des cas d'infections extra-intestinales uniquement [30].

1.3. Caractéristiques taxonomiques, phénotypiques et écologiques

1.3.1. Taxonomie

La caractérisation taxonomique de *Vibrio* était basée jusqu'à la moitié du vingtième siècle sur quelques critères phénotypiques tels que la morphologie des souches (présence de flagelles, incurvation des cellules, aspect des cultures) et le métabolisme des sucres. Ces critères donnèrent lieu à un certain nombre d'erreurs de classification de nouvelles espèces et même de genres. A la fin des années 1980, les outils d'identification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* se sont considérablement améliorés avec l'utilisation de batteries de tests phénotypiques plus adaptés et des analyses en taxonomie numérique reposant sur l'utilisation de différents composés comme source de carbone et d'énergie, l'étude des activités enzymatiques (arginine dihydrolase, gélatinase, chitinase, oxydase, catalase, lysine et ornithine décarboxylases), la tolérance au sel, la luminescence, le préférendum de température, les antibiogrammes et la composition en GC du génome [31]. Cependant, en raison de la variabilité génotypique au sein d'une même espèce et de la versatilité

phénotypique des souches environnementales, une classification reposant uniquement sur des critères phénotypiques peut poser des problèmes et aboutir à des erreurs de classification taxonomique. Par exemple dans le groupe polyphylétique *V. splendidus*, les outils phénotypiques tels que les galeries API ne permettent pas la distinction des quatre espèces du groupe, *V. kanaloe*, *V. lentus*, *V. chagasii* et *V. pomeroyi* [32], [33], de même, les galeries API20^E et 20NTF ne permettent pas la distinction de *V. harveyi* par rapport à *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* [34]. Depuis une vingtaine d'année, le développement d'outils de génotypage moléculaire, a considérablement enrichi les études de taxonomie des procaryotes. Dans un premier temps le séquençage des gènes ribosomiaux (ARNr 5S, 23S et notamment 16S) a permis de remanier la classification des *Vibrio* [35]. Par ailleurs, la très grande proximité des genres *Vibrio* et *Photobacterium* a pu être validée selon cette méthode [36]. Cependant l'analyse de la séquence ARNr 16S trouve ses limites dans la distinction de certaines souches, par exemple au sein du groupe *V. splendidus* [32], dans la distinction de *Vibrio brasiliensis* et *Vibrio tubiashii*, de *Vibrio coralliilyticus* et *Vibrio neptunius*, ou encore de *Vibrio anguillarum* et *Vibrio ordalii* [37]. L'hybridation quantitative ADN/ADN reste l'outil de référence pour la détermination spécifique d'une nouvelle souche bactérienne par rapport à la souche de référence la plus proche en phylogénie ARNr 16S. Le seuil admis est de 70% au niveau des hybridations ADN/ADN [38]. Aujourd'hui de nombreuses techniques de typage moléculaire plus ou moins discriminantes (Figures 1, Figures 2) sont disponibles pour des études de taxonomie comme l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARNr 16S ou Le typage par séquençage multilocus (MLST) et le phénotypage. La combinaison de ces outils a permis de mettre en évidence la nature polyphylétique des *vibrions* [39]. Dans une récente étude, SAWABE et al. (2013) [40] ont différencié de nouveaux groupes en se basant sur l'analyse de séquences *multilocus* (MLSA). Le pourcentage de similarité des séquences de 8 marqueurs génomiques (*gapA*, *gyrB*, *ftsZ*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* et *topA*) a permis de distinguer 23 groupes au sein de 96 espèces identifiées (Figure 1.3).

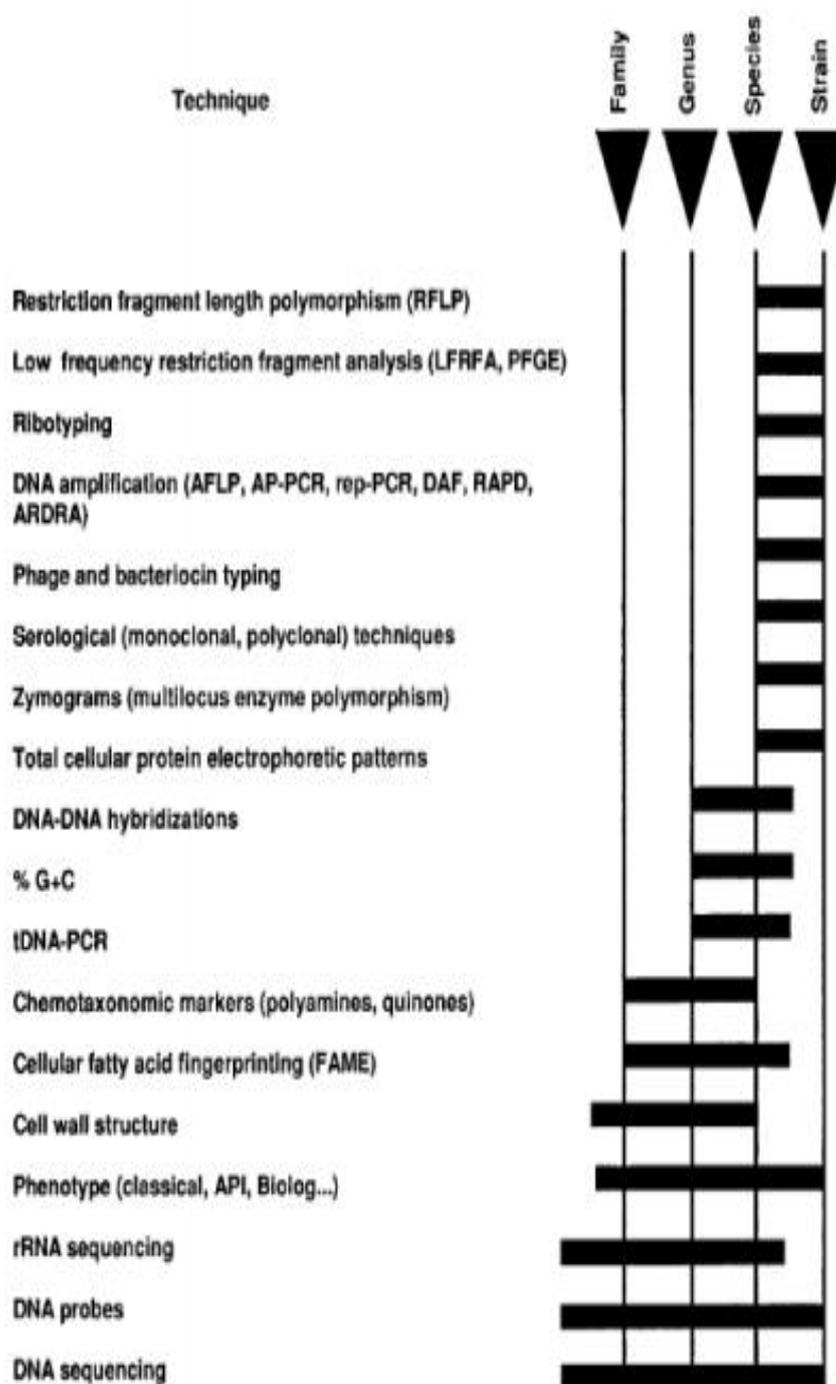


Figure 1.1 : Résolution taxonomique des outils de typage les plus couramment utilisés [41].

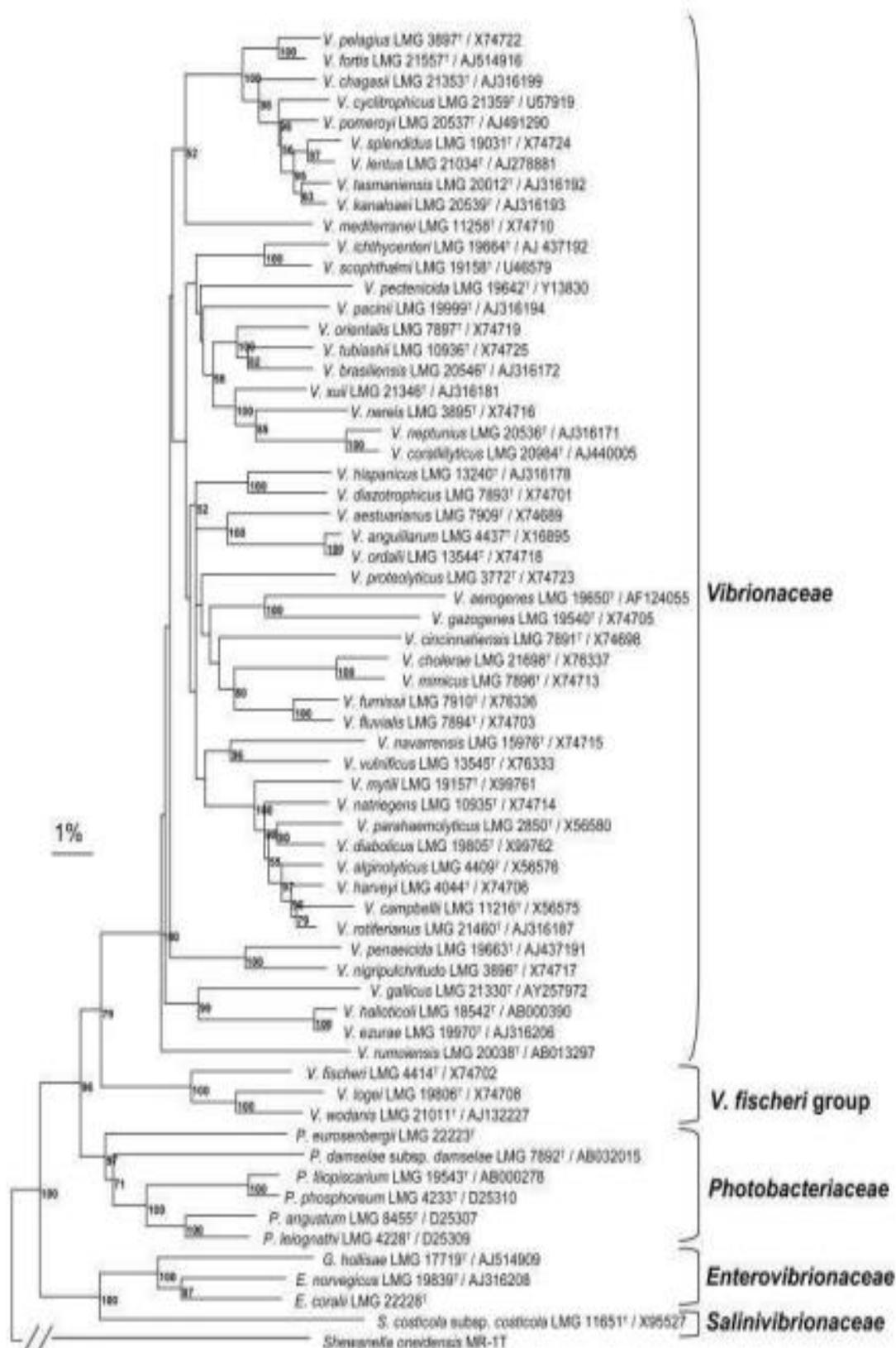


Figure 1.2 : Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences : ARNr 16S, recA et rpoA (2,898 bp), mettant en évidence différents groupes de *Vibrio*.

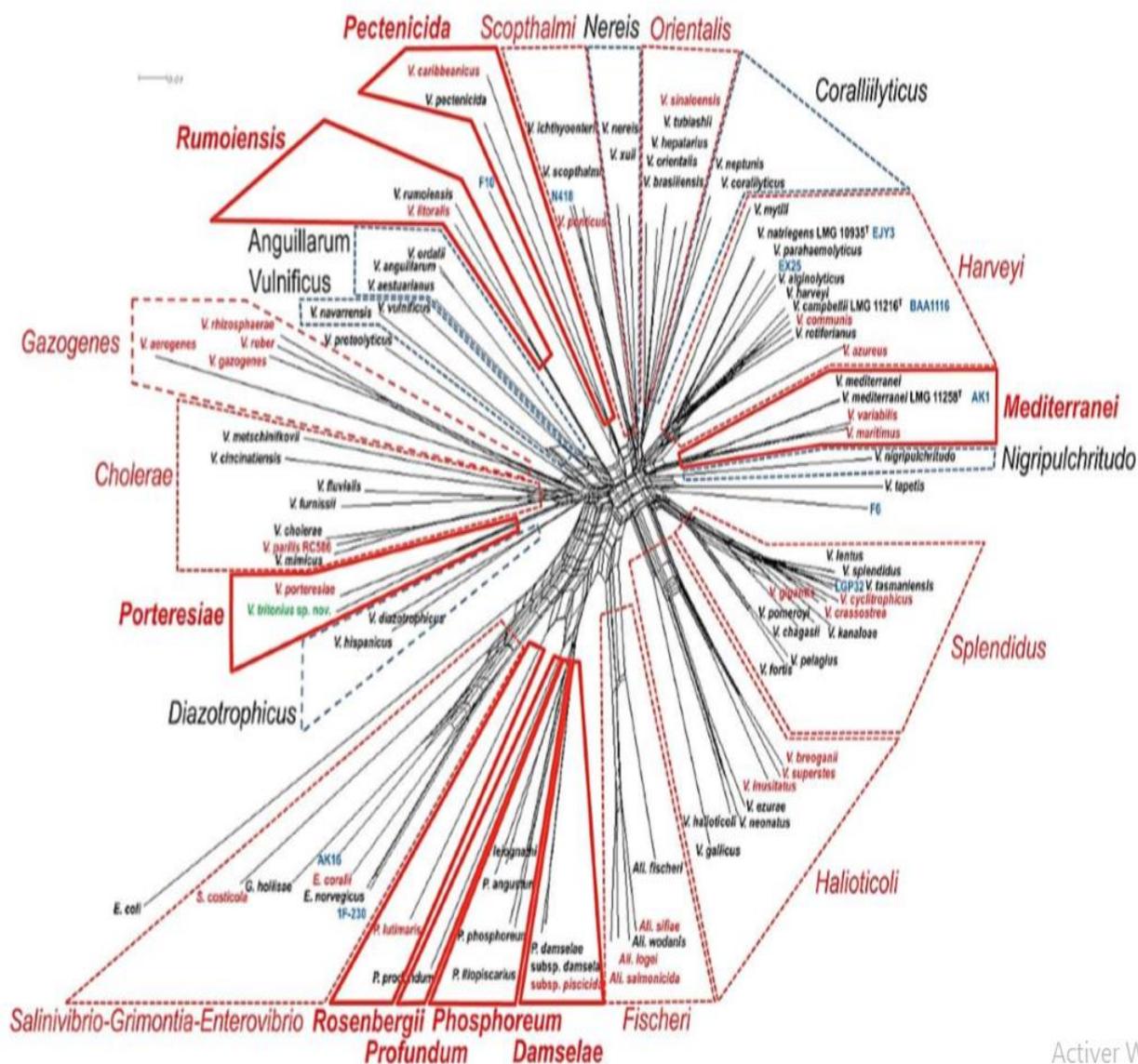


Figure 1.3 : Arbre phylogénétique fondé sur le séquençage de huit gènes de référence (gapA, gyrB, ftsZ, mreB, pyrH, recA, rpoA, et topA) des 96 espèces de *Vibrio*. Les nouveaux groupes sont indiqués en trait plein rouge et les lignes pointillées en rouge ou noir indiquent respectivement les groupes changés ou inchangés [40].

1.3.2. Caractéristiques phénotypiques

Le genre *Vibrio* est un genre essentiellement aquatique et principalement marin. Il regroupe des bactéries à Gram négatif, droites ou incurvées, de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,2 à 3,5 µm de longueur, non sporulées, aéro-anaérobies, à métabolisme oxydatif et fermentatif, le plus souvent oxydase positive, nitrate réductase positive, produisant souvent de l'acétoïne, chimio-organotrophes, fermentant (le plus souvent sans gaz). Le D-glucose, souvent capables de croître dans un milieu minéral

contenant du glucose comme unique source : de carbone, d'énergie et des ions NH_4^+ comme unique source d'azote [42].

Les *vibrions* sont caractérisés par une grande motilité. (Figure 1.4). Ils se déplacent dans les milieux liquides en « swimming » grâce à leurs flagelles polaires et dans les milieux solides en « swarming » via leurs flagelles latéraux [43]. Ils peuvent également avoir une motilité de type « twitching » générée par l'ancrage et les rétractions du pilus sur une surface solide [44], [45]. Toutefois certaines espèces sont dépourvues de flagelles et immobiles.

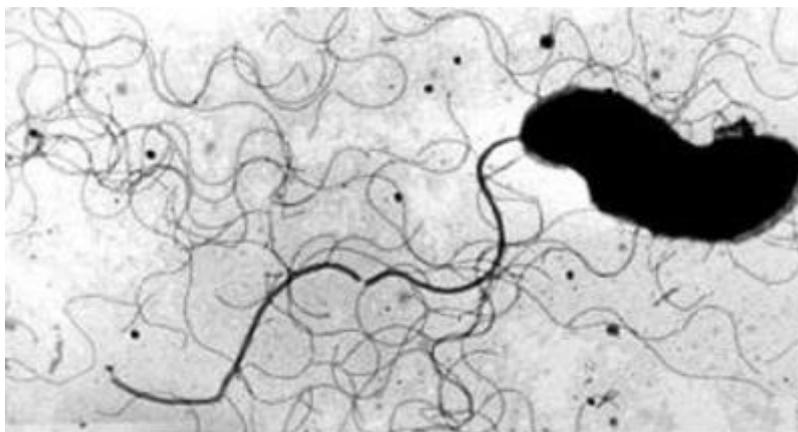


Figure 1.4 : Micrographie de *Vibrio pectenicida* souche A365T sur milieu solide montrant les flagelles polaires et latéraux ($\times 14000$) obtenue en microscopie électronique à transmission [46].

Les *Vibrio* poussent généralement sur milieu "marine agar". Une gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar) a été développée pour l'isolement sélectif de *V. cholerae* et de nombreux autres *Vibrio* peuvent également y être cultivés (Figure 1.5).



Figure 1.5 : Diversité phénotypique de deux souches appartenant au groupe *Vibrio* sur le milieu TCBS: [42]

1.3.3. Structure du génome :

D'un point de vue génétique, et contrairement à bon nombre d'autres bactéries, les *Vibrionaceae* présentent la particularité de posséder deux chromosomes circulaires de contenu génétique et de taille dissemblables. Grâce à l'utilisation de la génomique facilitée notamment par la petite taille des génomes bactériens, ces chromosomes ont été mis en évidence chez les espèces pathogènes pour l'homme par séquençage complet des génomes de *V. cholerae* [47], *V. parahaemolyticus* [48] et *V. vulnificus* [49] ainsi que chez d'autres espèces de *Vibrio* notamment par électrophorèse en champ pulsé [50]. Deux hypothèses sont émises quant à l'explication de cette partition, qui serait le résultat soit d'une acquisition ancestrale d'un mégaplasmide par transfert horizontal [47] soit d'une excision ancestrale du génome [51]. La majorité des gènes aux fonctions cellulaires essentielles (réplication, transcription, traduction, biosynthèse) et de virulence (capsule, toxine, antigène de surface, adhésine) est localisée sur le chromosome I généralement de plus grande taille (3Mb), alors que le chromosome II, plus petit (1 et 2 Mb) contient une proportion plus importante de gènes codant des protéines hypothétiques [47]. La question se pose alors de l'origine de cette partition du génome et des conséquences associées : pour Waldor et RayChaudury [51], la partition pourrait permettre à la bactérie d'achever plus rapidement la duplication de son génome et la division cellulaire, ce qui accentuerait la vitesse de croissance et donc la compétitivité de la bactérie dans un environnement sélectif.

1.3.4. Caractéristiques écologiques

Les *Vibrio* sont des bactéries aquatiques qu'on retrouve aussi bien dans l'eau douce que dans les habitats aquatiques salés tels que les eaux côtières, les estuaires et les infrastructures aquacoles. Ils jouent un rôle important dans la biodégradation, la régénération des nutriments et le cycle biogéochimique. Certaines espèces sont plus communes dans l'eau douce toutefois elles peuvent être transportées dans les environnements salés par le courant d'eau [52]. Ces bactéries vivent sous forme libre ou en formant des biofilms qui sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface biotique ou abiotique [53]. Ils peuvent également vivre en colonisant des animaux. En effet, plusieurs espèces ont été associées à des organismes marins comme les coraux [54], les poissons [19], les mollusques [26], les algues, les crevettes [55] et le zooplancton [47]. Le changement des paramètres de l'écosystème aquatique peut être critique à la survie et à la colonisation des bactéries. Parmi les facteurs environnementaux, la salinité, la disponibilité des nutriments et la température agissent sur l'abondance et la distribution des *Vibrio*. Par exemple, une température comprise entre 20 et 30°C augmente considérablement le nombre de bactéries [56], [57]. Pour s'adapter aux conditions environnementales hostiles, les *Vibrio* forment des biofilms [58]. Ce mode de vie favorise la croissance des communautés bactériennes en donnant accès aux nutriments et les protège aussi des prédateurs et des substances antimicrobiennes [59].

Un autre moyen de survie des *vibrions* dans l'environnement est l'état « viable non cultivable » (VBNC) [60], [61]. Dans cet état, les bactéries sont métaboliquement actives mais elles ne forment pas de colonies quand elles sont étalées sur un milieu de culture conventionnel. Le passage à l'état de VBNC peut s'accompagner de modifications morphologiques comme la réduction de la taille des cellules observées pour des souches de *V. cholerae* [62].

1.4. Pouvoir pathogène

Les bactéries peuvent être classées selon leur pouvoir pathogène qui représente leur capacité potentielle à produire une maladie [63]. Ces microorganismes regroupent différentes catégories incluant des commensales avirulentes, des opportunistes qui

peuvent causer des dommages en cas d'affaiblissement de l'hôte et des pathogènes virulentes en toutes circonstances. Le groupe de *Vibrio* contient aussi bien des bactéries symbiotiques que des pathogènes pour l'homme ou les organismes marins comme les poissons, les crustacés et les mollusques.

1.4.1. Espèces de *Vibrio* pathogènes chez l'homme

Plus de 12 espèces de *Vibrio* ont été décrites comme impliqués dans des infections humaines allant de la simple surinfection de plaie cutanée, otite externe, jusqu'à des septicémies souvent mortelles en passant par des syndromes digestifs (gastro-entérites, iléites,...) parfois graves. Ainsi, des tableaux cliniques variés correspondant à des pathologies diverses peuvent être causés par des infections à *Vibrio* (Tableau 1). Toutefois, certaines maladies sont plus fréquemment rencontrées, mieux connues et responsables de complexes pathologiques bien identifiés. Ainsi, les trois principales espèces de *Vibrio* responsables de mortalités conséquentes pour l'homme et posant des problèmes de santé publique sont *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. Ces bactéries peuvent infecter leur hôte soit par voie orale après ingestion d'aliments ou d'eau contaminée par des excréments humains ou eaux usées ou encore des fruits de mer et poisson crus, soit par voie cutanée en exposant des coupures ou blessures ouvertes à l'environnement aquatique et les animaux marins [64], [65].

Tableau 1.1 : Association des espèces de *Vibrio* pathogènes avec les syndromes cliniques [52].

Espèces de <i>Vibrio</i>	Septicémie primaire	Gastroentérite	Infection des plaies
<i>V. cholerae</i> O1	*	+++	+
<i>V. cholerae</i> non-O1	+	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+++	++
<i>V. vulnificus</i>	+++	++	+++
<i>V. fluvialis</i>	*	++	*
<i>V. alginolyticus</i>	+	*	+++
<i>V. damsela</i>	*	*	+++
<i>V. furnissii</i>	*	+	*
<i>V. hollisae</i>	+	++	*
<i>V. mimicus</i>	*	++	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	*
<i>V. cincinnatiensis</i>	+	*	*

+++ Association courante ; ++ Association possible ; + Association rare ; * Association non établie avec certitude.

a. *Vibrio cholerae*

V. cholerae est l'agent étiologique du choléra. Il s'agit d'une infection intestinale sévère caractérisée par une diarrhée aiguë pouvant aboutir sans thérapie de réhydratation adéquate, à une déshydratation mortelle en quelques jours. Depuis 2000, l'incidence du choléra a augmenté régulièrement. Entre 2003 et 2004, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a signalée 15 000 nouveaux cas de choléra seulement en Afrique, principalement au Mali, au Mozambique et en Zambie. En octobre 2010, des cas de choléra ont été rapportés en Haïti pour la première fois depuis plus de cent ans. La recherche a révélé qu'il s'agit du *V. cholerae* sérogroup O1, biotype Ogawa. Jusqu'en juillet 2011, plus de 220 000 cas avaient été enregistrés, dont 5 968 décès [66], [67], [68].

Les souches de *V. cholerae* décrites présentent des statuts de virulence variables avec l'existence de souches non pathogènes et d'autres hautement pathogènes. La classification des souches de *V. cholerae* se fait à partir de la caractérisation de l'antigène O (un constituant des lipopolysaccharides : LPS de la membrane externe) qui présente une grande diversité sérologique permettant de définir plus de 200 sérogroupes. Certains sérogroupes ont été subdivisés en biotypes, comme par exemple le sérogroup O1 divisé en biotype classique et en biotype El Tor. Depuis 1992, un autre sérogroup est apparu au Bengale et au Bangladesh causant des mortalités, il s'agit du sérogroup O139 qui pourrait donner naissance à la huitième pandémie de cholera [69]. La principale voie de contamination passe par l'ingestion de produits de la mer et par l'eau lorsque les conditions sanitaires ne sont pas satisfaisantes (traitement de l'eau notamment). On compte parmi les réservoirs de *V. cholerae*, des copépodes, des plantes aquatiques, des insectes chironomides et des cyanobactéries [70], [71], [72]. Un modèle des facteurs de risques et des facteurs déclenchant le cholera est présenté en figure 1.6.

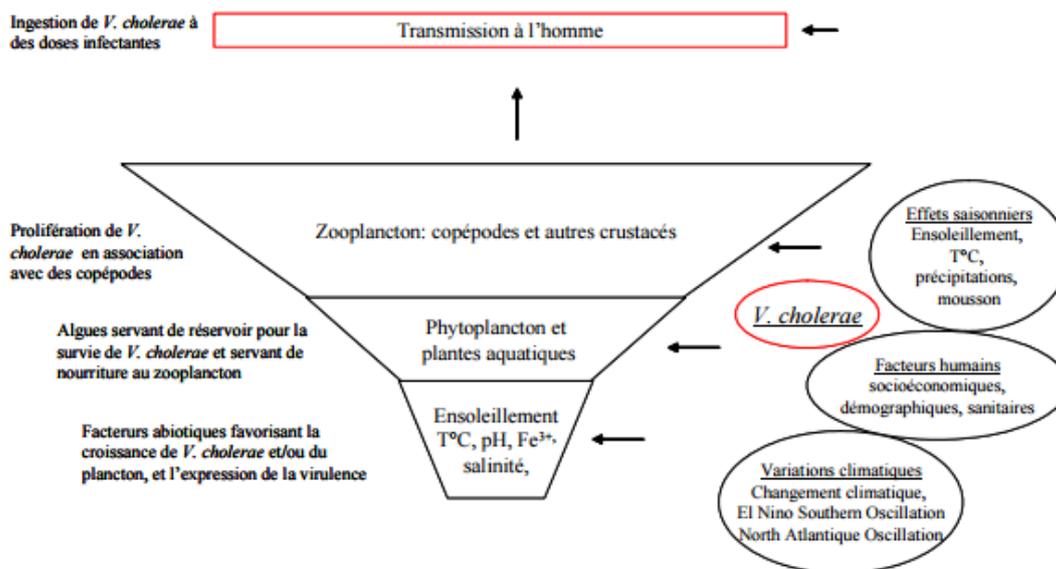


Figure 1.6 : Modèle des facteurs environnementaux impliqués dans la transmission du choléra [70].

b. *Vibrio vulnificus*

V. vulnificus est un agent infectieux pour l'homme, transmis par la consommation de fruits de mer contaminés ou par contact d'une blessure avec de l'eau de mer et pouvant aboutir dans les cas les plus aigus à des blessures graves, ou une septicémie mortelle dans 65-75 % des cas, parfois en moins de 24 h. Certains cas de gastroentérites ont par ailleurs été associés à ce pathogène. On compte quelques centaines de morts tous les ans causés par *V. vulnificus*, un peu partout dans le monde. Trois biotypes ont été décrits sur la base des LPS, de la capsule et plus récemment sur des analyses génétiques. Le biotype I est le principal pathogène pour l'homme ; le biotype II (reclassé en séro groupe E puisqu'un seul type de LPS a été identifié pour ces souches) concerne essentiellement des infections chez l'anguille, mais certains cas d'infections associés à ce biotype ont été décrits chez l'homme ; enfin, le biotype III a été identifié dans quelques cas de maladie infectieuse chez l'homme [73]. Au sein de chaque biotype ainsi caractérisé, on retrouve des souches au pouvoir hautement pathogène et non pathogène. Le typage du biotype I se faisait principalement sur la base de 5 types de LPS, mais il s'est avéré qu'un certain nombre de souches (39 à 49%) ne pouvaient être typées par cette approche, du fait d'une grande hétérogénéité antigénique de ces souches. Depuis, d'autres approches basées

sur le typage antigénique de la capsule, sur du ribotypage, des profils PFGE, d'ARNr16S et de PCR-RFLP ont abouti aux mêmes conclusions, à savoir le caractère extrêmement polymorphe des souches de *V. vulnificus* et l'impossibilité d'associer systématiquement et de façon précise, un statut de virulence donné à un groupe phylogénétique ou à un biotype particulier.

Parmi ces facteurs de virulence, la capsule polysaccharidique (CPS) semble jouer un rôle important dans l'inflammation et dans la résistance aux réponses immunitaires [74].

c. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus est la principale cause de la gastroentérite engendrée via les fruits de mer crus ou insuffisamment cuits [75]. Son pouvoir pathogène est lié à la production des hémolysines TDH (*Thermostable Direct Hemolysin*) et TRH (*TDH-Related Hemolysin*), apparentée à la toxine TDH [76], [77]. Ces enzymes ont des activités lytiques, cytotoxiques et entérotoxiques. Elles lysent les érythrocytes et perturbent l'organisation du cytosquelette ainsi que l'homéostasie du calcium [78]. Dans le milieu naturel, la plupart des souches de *V. parahaemolyticus* ne sont pas pathogènes [79]. En revanche, les bactéries isolées de patients infectés possèdent les gènes codant pour au moins une des deux hémolysines [80], [77].

La classification de *V. parahaemolyticus* se fait sur la base du sérotypage mettant en évidence 13 sérogroupes de type O et 71 sérogroupes de type K (en rapport avec les propriétés antigéniques de la capsule). Plusieurs sérogroupes sont connus pour induire des infections. Toutefois, la corrélation entre le sérotype et le caractère pathogène des bactéries n'a pas été établie jusqu'à l'apparition, en 1996, de souche responsable des maladies appartenant au sérotype O3 :K6. Depuis, cette bactérie, a été détectée dans plusieurs endroits dans le monde où la consommation de poissons et fruits de mer crus est importante comme au Chili, en France, au Japon, en Corée, en Espagne, à Taïwan, aux Etats-Unis, et particulièrement dans les pays d'Extrême-Orient comme l'Inde, le Bangladesh et la Thaïlande [81], [82], [83], [84]. [85], [86], [87].

1.4.2. Les vibrions pathogènes des organismes marins

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries dominantes des écosystèmes marins. A part quelques espèces pathogènes pour l'homme, la majorité des espèces

pathogènes affecte les animaux marins. Le genre *Vibrio*, associé à d'autres groupes comme *Achromobacter*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*, constitue une grande proportion de la flore bactérienne du monde aquatique [88]. Cependant, certaines espèces sont classées comme des agents étiologiques responsables des pertes économiques importantes dans plusieurs filières aquacoles.

a. chez les poissons

Aujourd'hui, chez les poissons, 17 espèces de *Vibrio* sont potentiellement impliquées dans des épisodes de mortalité [89], dont les plus étudiées posent d'importants problèmes en aquaculture : *V. anguillarum* et *V. salmonicida*.

Le tableau 1.2 réunit l'ensemble des *vibrions* décrits comme pathogènes chez les poissons.

Tableau 1.2 : Espèce de *Vibrio* pathogène de poissons (adapté de Buller) [89].

Poissons	Espèces pathogènes	Organismes Susceptibles	Références
		<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i> .	<i>Cynoglossus semilaevis</i>
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Fugu vermicularis</i> <i>Sparus aurata</i> .	(Noguchi <i>et al.</i> , 1987) (Colorni <i>et al.</i> , 1981)
	<i>V. anguillarum</i>	<i>Salmo salar</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Plecoglossus altivelis</i>	(Frans <i>et al.</i> , 2011)
	<i>V. cholerae</i> non O1	<i>Plecoglossus altivelis</i>	(Kiiyukia <i>et al.</i> , 1992)
	<i>V. damsela</i>	<i>Chromis punctipinnis</i> <i>Seriola quinqueradiata</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Dasyatis pastinaca</i> <i>Orectolobus ornatus</i>	(Love <i>et al.</i> , 1981) (Sakata <i>et al.</i> , 1989) (Fouz <i>et al.</i> , 1992) (Pedersen <i>et al.</i> , 1997)
	<i>V. harveyi</i>	<i>Epinephelus coioides</i> et autres espèces de poissons <i>Paralichthys dentatus</i> <i>Acanthurus sohal</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2002; Yii <i>et al.</i> , 1997) (Soffientino <i>et al.</i> , 1999) (Hashem & El-Barbary, 2013)
	<i>V. ordalli</i>	<i>Oncorhynchus keta</i>	(Ransom <i>et al.</i> , 1984; Schiewe <i>et al.</i> , 1981)
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Aphanius iberus</i> Plusieurs espèces de poissons démersaux et poissons pélagiques	(Alcaide <i>et al.</i> , 1999) (Sudha <i>et al.</i> , 2012)
	<i>V. splendidus</i>	<i>Labrus bergylta</i> <i>Ctenolabrus rupestris</i>	(Birkbeck & Treasurer, 2014)
	<i>V. vulnificus</i> biotype 2	<i>Anguilla japonica</i> <i>Anguilla anguilla</i>	(Tison <i>et al.</i> , 1982) (Biosca <i>et al.</i> , 1991)

➤ *Vibrio anguillarum*

V. anguillarum est un agent infectieux tout d'abord décrit chez l'anguille en 1909 en Mer Baltique, puis chez une cinquantaine d'espèces de poissons de l'atlantique et du pacifique et responsable aujourd'hui des mortalités les plus importantes imputées à une espèce de *Vibrio*, chez les poissons en général et les salomonidés en particulier.

Ce pathogène pose aujourd'hui de réels problèmes en aquaculture. Les principales affections provoquées par *V. anguillarum* sont une septicémie hémorragique, une nécrose du cœur, des reins et de la rate, ainsi qu'une atteinte au niveau des yeux et de l'intestin. Cependant, la vitesse de l'infection peut être si rapide dans les cas les plus sévères, qu'aucun symptôme n'est observé avant la mort de l'animal [19].

La classification de *V. anguillarum* se fait sur la base du sérotypage mettant en évidence 23 sérogroupe de type O (O1 à O23). Les souches appartenant au sérogroupe O1 sont les plus pathogènes pour les poissons en général, alors que les souches classées dans le sérogroupe O2 sont plus fréquemment associées aux mortalités de l'anguille. Enfin, si les souches de type O3 sont très communément isolées du milieu marin, elles ne sont que rarement associées à des épisodes de mortalités [90].

➤ *Vibrio salmonicida*

Vibrio salmonicida est responsable de la maladie d'Hitra appelée également « la vibriose de l'eau froide ». Elle affecte le saumon et la morue cultivés au Canada et dans les pays nordiques [91], [92], [93]. Cette bactérie agit à des températures basses au-dessous de 15°C et provoque une anémie sévère et une importante hémorragie [94].

b. Chez les mollusques

Les *Vibrio* affectent les mollusques marins quels que soit leur famille, genre ou espèce. Chez les céphalopodes, *V. alginolyticus* infecte les seiches *Sepia officinalis*, *S. apama* et *S. pharaonis* [95], [96], tandis que *V. lentus* provoque des lésions de la peau chez la pieuvre sauvage *Octopus vulgaris* [97]. Chez les gastéropodes, Li et al. (1998) [98] ont reproduit la maladie des pustules blanches de l'ormeau *Haliotis discus*

après infection expérimentale par des souches de *V. fluvialis* II. De même, NICOLAS et al. [99] ont prouvé la pathogénicité de *V. carchariae* qui infecte les populations sauvages et d'élevage d'*Haliotis tuberculata*.

Les bivalves constituent la classe la plus touchée par la *vibriose*. Depuis les épisodes de mortalités observées dans les élevages d'huitres, les études se sont multipliées et différentes souches bactériennes ont été identifiées. [100], [101], [102], [103], [42].

Le Tableau 3 récapitule les principales espèces ou groupes décrits.

Tableau 1.3 : Exemples d'espèces de *Vibrio* pathogènes pour les mollusques bivalves [42].

Espèces	Hôte	Références
Groupe <i>V. Splendidus</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Perna canaliculus</i> <i>Pecten maximus</i> <i>Venerupis decussatus</i> <i>Venerupis rhomboides</i>	Lacoste et al., 2001; Saulnier et al., 2010 Thompson et al., 2003 Kesarcodi-Watson et al., 2009 Lambert et al., 1999; Nicolas et al., 1996 Gómez-León et al., 2005 Lago et al., 2009
Groupe <i>V. Harveyi</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Venerupis decussatus</i> <i>Pinctada maxima</i>	Saulnier et al., 2010 Gómez-León et al., 2005 Pass et al., 1987
<i>V. tubiashii</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Crassostrea virginica</i> <i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Ostrea edulis</i>	Travers et al., 2014 Tubiash et al., 1965 Jeffries, 1982; Lodeiros et al., 1987
<i>V. aestuarianus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Garnier et al., 2007; Labreuche et al., 2010
<i>V. coralliilyticus</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Perna canaliculus</i>	Genard et al., 2013 Kesarcodi-Watson et al., 2009
<i>V. tapetis</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Cerastoderma glaucum</i> <i>Pecten glaber</i> <i>Donax trunculus</i> <i>Lithophaga lithophaga</i>	Paillard et al., 2006 El Bour et al., 2008

On distingue particulièrement le groupe *V. Splendidus* qui est souvent relié à plusieurs épisodes de mortalités. Ce clade polyphylétique rassemble jusqu'à aujourd'hui 16 espèces dont certaines sont pathogènes des bivalves (*V. celticus*, *V. crassostreae*, *V.*

cyclitrophicus, *V. tasmaniensis* et *V. splendidus*) et d'autres ne le sont pas [104], [105], [106], [107]. Toutefois, ces bactéries à pathotypes contrastés peuvent collaborer dans les infections polymicrobiennes. En effet, les souches virulentes et avirulentes peuvent interagir et faciliter la pathologie induite chez l'huître par *V. crassostreae* [108] ou *V. tasmaniensis* [109].

c. Chez les crustacés

La *vibriose* touche plusieurs espèces de crustacés. Chez les crabes marins, l'infection entraîne une bactériémie ou une maladie de la coquille [110]. De fait, des bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées à partir de l'hémolymphe du crabe bleu *Callinectes sapidus* [111], [112], de *Callinectes bocourti* [113] et du crabe de roche *Cancer irroratus* [114]. De plus, la pathogénicité des isolats a été démontrée en conditions expérimentales [114]. Similairement, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* ont été décrits comme agents causatifs de la maladie de la coquille chez le homard [115]. La souche luminescente *V. harveyi* a également induit des mortalités importantes dans les cultures des larves de *Sagmariasus verreauxi* en Nouvelle Zélande [116]. L'infection à *V. harveyi* se traduit par une anorexie, un retard de croissance et un ralentissement de la nage chez la crevette affectée. Les animaux deviennent opaques, éventuellement luminescents (d'où le nom de "luminescent bacterial disease" parfois donné à la maladie) et ils présentent une dégénérescence tissulaire de l'hépatopancréas [117]. Ces mêmes espèces (*V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*) ainsi que *V. anguillarum* et *V. splendidus* ont été associées aux pathologies observées dans les élevages de la crevette *Penaeus monodon* en Inde [118]. Les souches *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida* ont aussi induit d'importantes mortalités chez les crevettes *Litopenaeus stylirostris* cultivées en Nouvelle zélande [119], [120]. [121].

d. Chez les coraux

Le blanchiment est l'une des maladies les plus sévères et les plus répandues chez le corail [122]. Elle se traduit par une décoloration due à l'interruption de la symbiose entre les coraux et les microalgues (les zooxanthelles) [123]. Ce phénomène est généralement corrélé à des conditions environnementales particulières telles que

l'élévation de la température ou la réduction de la salinité mais aussi à la présence de bactéries pathogènes du genre *Vibrio* [124].

Vibrio shiloi est l'agent étiologique du blanchiment d'*Oculina patagonica*. Sa virulence est strictement reliée à une température élevée, comprise entre 24 et 29°C [125], [126]. Dans ces conditions, la bactérie pénètre dans les tissus de son hôte et se transforme en une forme viable et non cultivable (VBNC) lui permettant de se multiplier [127]. De plus, son internalisation est accompagnée de la production d'une toxine P capable d'inhiber la photosynthèse du zooxanthelle [128].

Vibrio coralliilyticus est également un pathogène dépendant de la température, qui affecte *Pocillopora damicornis*. En effet, il est capable d'induire le blanchiment à 25°C et de lyser les tissus entre 27 et 29°C [129], [130], [131]. Récemment, RUBIO-PORTILLO et al. [132] ont démontré que *V. coralliilyticus* peut agir en synergie avec *V. shiloi* et induire la maladie à des températures moins importantes (20°C).

V. alginolyticus et différents *Vibrio* spp non identifiés ont été isolés du corail affecté par la maladie de la bande jaune chez *Monastraea spp* dans la mer des caraïbes [133]. Les espèces de *Vibrio* incriminés s'attaqueraient aux zooxanthelles plutôt qu'aux polypes du corail et le mécanisme infectieux serait étroitement lié à la température, à l'instar des deux autres maladies du corail causées par *Vibrio coralliilyticus* et *Vibrio shiloi*.

1.5. Les facteurs de virulence du genre *Vibrio*

1.5.1. La notion de virulence chez les bactéries

Avant de décrire les facteurs de virulence associés au genre *Vibrio*, il est indispensable de différencier les notions de pathogénicité et virulence et de comprendre la relation entre ces deux concepts. Classiquement décrit, un agent pathogène est un microorganisme qui provoque une maladie ou qui peut se multiplier dans le tissu vivant et induire des maladies [134] et le pouvoir pathogène est la capacité d'un microorganisme à induire une maladie [135]. Cette interprétation des termes suggère que la pathogénicité est une caractéristique liée seulement au microorganisme et indépendante de l'hôte. Or cette définition semble insuffisante car un microorganisme peut coloniser sans nuire à l'hôte. En 1999, CASADEVALL et PIROFSKI [63] ont

apporté des améliorations dans les définitions de base [63]. Ainsi, un agent pathogène est un microorganisme capable de causer des dommages à l'hôte et le pouvoir pathogène est la capacité d'un microorganisme à causer des dommages à l'hôte. Avec cette nouvelle reformulation des définitions, la pathogénicité n'est plus une caractéristique invariante et indépendante de l'hôte mais le résultat d'une interaction entre l'hôte et le microorganisme [63]. Concernant la virulence, plusieurs définitions ont été aussi proposées à cette notion [63] :

- Le degré de la pathogénicité
- La force de l'activité d'un pathogène
- Le synonyme de la pathogénicité
- Le pourcentage de mortalité par infection
- La capacité relative de surmonter la défense disponible d'un hôte
- La mesure de la capacité d'un microorganisme à infecter ou endommager un hôte
- La capacité relative d'entrer et de se multiplier dans un hôte donné
- La gravité de la maladie.

Plus tard, une définition plus drastique a été accordée à la notion de la virulence et qui associe de la même manière l'hôte et l'agent infectieux : c'est la capacité relative d'un microorganisme à causer des dommages à l'hôte [63]. Certaines définitions varient entre et au sein des disciplines [136] et peuvent entraîner une confusion. Ainsi, la majorité des pathologistes choisissent d'utiliser une définition au sens large qui associe la notion de la virulence à la notion de la pathogénicité [137]. De même, la terminologie utilisée pour décrire les facteurs de virulence a été modifiée pour passer de « produits microbiens qui permettent à un agent pathogène de provoquer une maladie » [134] à une définition au sens large « tout composant d'un microorganisme qui est nécessaire ou qui potentialise sa capacité à provoquer une maladie » [138]. Cette définition absolue inclut implicitement les substances non toxiques pour l'hôte qui peuvent quand même être considérées comme des facteurs de virulence si leur absence rend le microorganisme moins virulent [138].

Enfin, il est important de considérer les thèmes suivants :

- Très peu de facteurs de virulence fonctionnent comme des facteurs déterminants de la virulence
- les dommages sont causés soit directement par les microorganismes ou par un composant microbien soit par la réponse immunitaire de l'hôte

- les réponses immunitaires peuvent neutraliser plusieurs ou une partie des facteurs de virulence [139].

1.5.2. Plasticité génomique

Ces définitions, même si elles ont le mérite de clarifier les idées, ne sont que trop figées et simplistes aux vues des capacités des génomes, et plus particulièrement des génomes bactériens, à se modifier au cours du temps et en fonction des conditions de l'environnement. Cette plasticité génomique est non seulement source d'adaptabilité mais également à la base de l'évolution des bactéries pathogènes (Figure 1.7) [140].

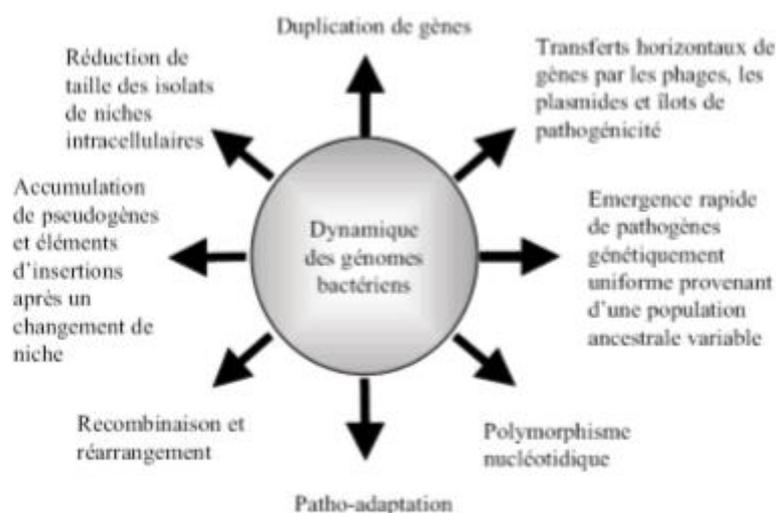


Figure 1.7 : Dynamique des génomes bactériens [140].

Les bactéries ont la capacité d'acquérir (et de perdre) de l'ADN exogène par le biais de trois grands mécanismes de transferts horizontaux de gènes (HGT) qui sont :

1. la transformation (transfert génétique d'ADN libre et nu de l'environnement)
2. la transduction (infection par un bactériophage)
3. la conjugaison (transfert d'ADN sous la forme plasmidique d'une bactérie à l'autre par le biais d'un pilus).

Ces trois mécanismes font intervenir des éléments génétiques mobiles, comme des phages, plasmides et transposons (Figure 1.8).

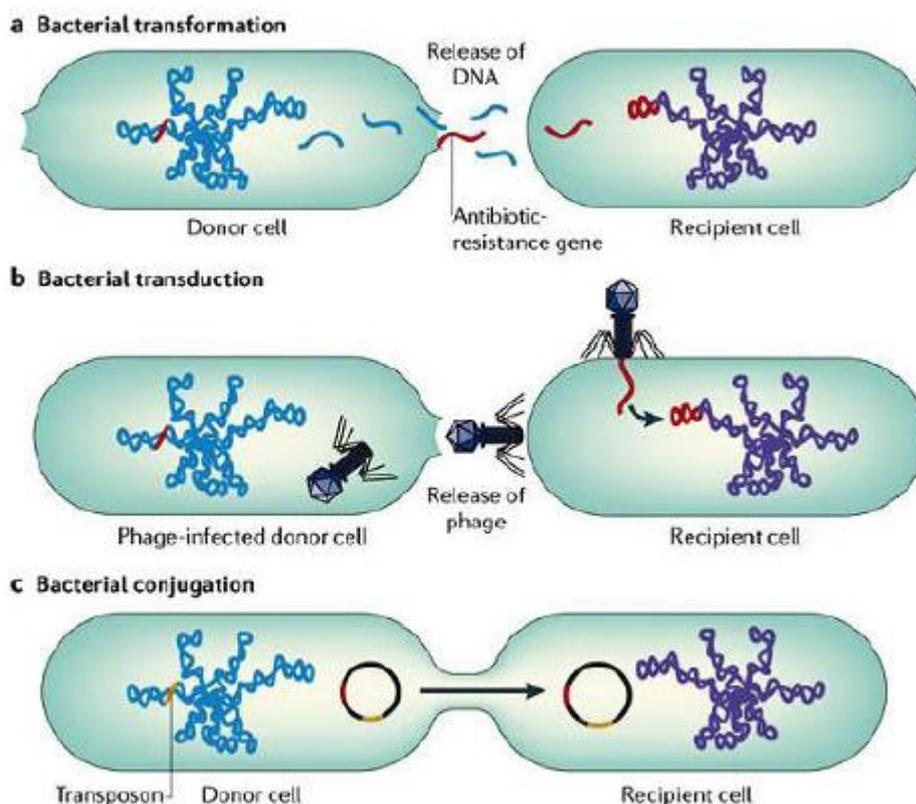


Figure 1.8 : Les trois grands mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries [141].

De nombreuses études portent sur ces mécanismes de transferts horizontaux qui apparaissent très répandus chez les *Vibrionaceae* [142], [143]. Ces acquisitions de gènes ou groupes de gènes confèrent des avantages adaptatifs variés, comme une résistance à un stress antibiotique [144], l'acquisition de gènes codant des protéines mieux adaptées à un nouvel environnement, une nouvelle voie métabolique permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique ou encore une virulence et ses déterminants.

Ces mécanismes de transferts horizontaux, qui peuvent être observés à l'échelle interspécifique, peuvent donc générer de profondes modifications phénotypiques et ce sur une très courte échelle de temps. Non seulement ils peuvent expliquer pour partie la variabilité extraordinaire des propriétés métaboliques et des caractéristiques phénotypiques des bactéries, mais aussi ils rendent compte d'un réel dynamisme du génome bactérien et apparaissent donc comme un puissant moteur de l'évolution [145]. Par ce biais, de nouveaux pathogènes peuvent émerger ou la virulence d'un

agent déjà pathogène peut s'accroître considérablement. La définition de la virulence n'apparaît donc plus limitée à la caractéristique d'un agent pathogène mais devient un phénomène complexe (au sens de délicat à décrire, car composé de nombreux éléments interagissant entre eux de manière parfois non déterministe), dynamique et changeant, dépendant des facteurs de l'agent pathogène, de la sensibilité de l'hôte et de la nature de leurs interactions [136].

1.5.3. Les mécanismes de virulence des *Vibrio*

Qu'ils soient majeurs ou accessoires, qu'ils présentent des rôles directs ou indirects dans la pathogenèse, de nombreux facteurs de virulence bactériens ont été décrits et leur classification en catégorie fonctionnelle peut paraître réductrice compte tenu de la complexité dynamique des combinaisons et interactions qui conduisent au développement d'une infection et à l'expression d'une maladie [146]. L'implication des facteurs de virulence des pathogènes opportunistes dans les processus d'infection est particulièrement difficile à caractériser puisqu'elle est intimement dépendante de l'état immuno-physiologique de l'individu-hôte infecté qui détermine sa sensibilité à l'agent infectieux. Tous participent à différentes étapes de l'infection bactérienne, de la colonisation des surfaces de l'hôte à la pénétration dans l'hôte, de l'invasion et la colonisation dans l'environnement de l'hôte, de l'inhibition ou la perturbation du système immunitaire de l'hôte, de l'échappement à ce système immunitaire et enfin de la perturbation ou la destruction des fonctions essentielles de l'hôte. Il est cependant clairement établi que certaines catégories fonctionnelles des facteurs de virulence sont chevauchantes et que certains déterminants peuvent être attribués à plus d'un groupe [147]. Néanmoins et dans un souci de synthèse, on peut distinguer arbitrairement trois types de facteurs de virulence produits par les bactéries :

1. les facteurs de colonisation et d'invasion de l'hôte,
2. les facteurs capables de perturber, d'altérer ou de détruire des fonctions essentielles de l'hôte
3. les facteurs d'échappement au système immunitaire de l'hôte

Ces facteurs de virulence ont été plus particulièrement identifiés chez les *Vibrio* pathogènes pour l'homme précédemment évoqués et dont les génomes ont été entièrement séquencés, *V. cholerae*, *V. paraheamolyticus*, *V. vulnificus* [47], [48], [49]

mais également chez *V. anguillarum*, *V. harveyi* ou d'autres espèces pathogènes de poissons, de crustacés et de mollusques [148].

a- Les facteurs de colonisation et d'invasion de l'hôte

- Le flagelle

La mobilité est une caractéristique commune aux organismes pathogènes, intimement associée à la virulence de ces derniers, et leur conférant un avantage adaptatif évident. En effet, elle leur attribue une capacité de migration vers des niches écologiques préférentielles tels que certains tissus de l'hôte, de mise en contact avec les cellules de l'hôte et de pénétration des membranes cellulaires, d'échappement aux substances toxiques et enfin de fuite du compartiment intracellulaire et de dispersion dans l'environnement pendant la transmission. La plupart des cellules bactériennes et notamment de *Vibrionaceae* sont mobiles grâce à l'action d'organites spécialisés, les flagelles (Figure 1.9) [149].

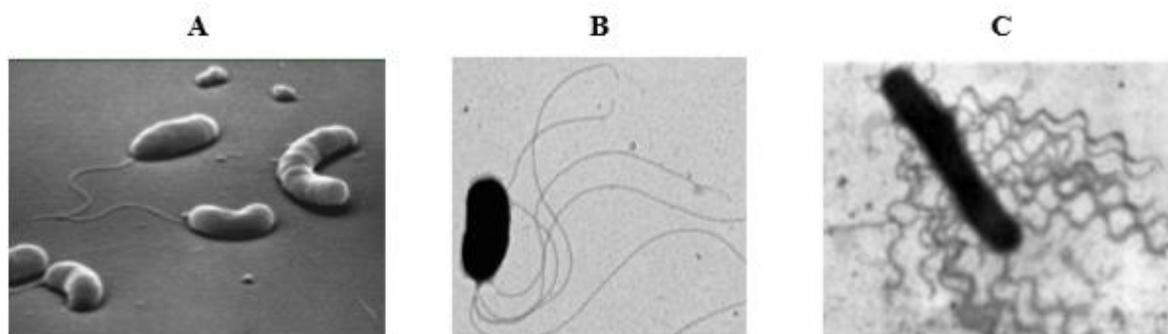


Figure 1.9 : A. Flagelle polaire unique chez *V. cholerae* , B. Flagelles multiples chez *V. fisheri* et C. Flagelles latéraux multiples chez *V. parahaemolyticus* .

Ce flagelle est une structure ancrée dans la membrane plasmique, semi-rigide et rotative, actionnée par un moteur moléculaire qui entraîne un filament agissant comme une hélice. La capacité des bactéries à moduler le sens de rotation du flagelle permet une propulsion orientée de la cellule procaryote vers des substances attractives [150] ou à l'opposé de substances répulsives [151] : ce mouvement dirigé (non-aléatoire) est appelé chimiotactisme.

Deux types de mobilité sont observés chez les *Vibrio* : la mobilité de type « swimming » assurée par un seul flagelle polaire et adaptée à des environnements aqueux de faible densité comme l'eau de mer et la mobilité de type « swarming » assurée par des

flagelles latéraux et adaptée à des environnements visqueux comme le mucus retrouvé au niveau de l'épithélium de certains hôtes [152]. Les *Vibrio* possèdent le plus souvent un flagelle polaire unique, des flagelles latéraux ont été décrits chez *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. harveyi* [149].

Le mouvement du flagelle est assuré par un couplage osmo-mécanique, à partir d'un gradient électrochimique qui permet le passage d'ions Na^+ (concernant la plupart des flagelles polaires) ou H^+ (concernant plus généralement les flagelles latéraux) au travers de la membrane et qui fournit l'énergie osmotique convertie en énergie mécanique.

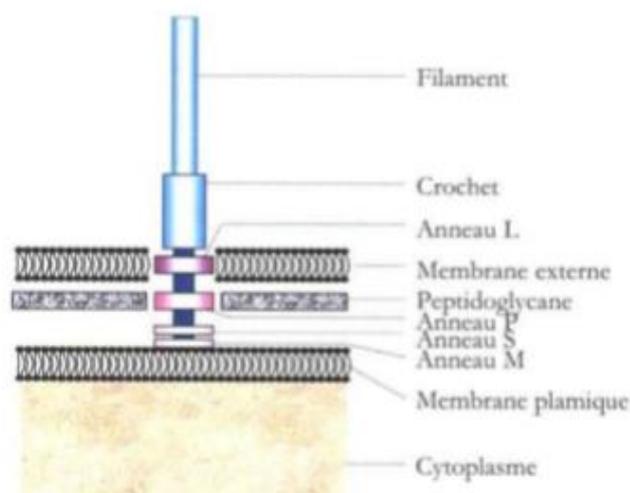


Figure 1.10 : Ultrastructure du flagelle bactérien de bactérie Gram négatif [149].

La mobilité bactérienne est un processus complexe qui nécessite une forte dépense en énergie, pouvant constituer une part importante du métabolisme de la cellule (2% de l'énergie totale chez *Escherichia coli*). Il est dépendant d'une cinquantaine de gènes régulés par de nombreux mécanismes de contrôle et dont la mutation résulte le plus souvent en une atténuation de la virulence. En effet, chez *V. vulnificus*, la création de mutants présentant des délétions au niveau des gènes *flgC* et *flgE* codant le flagelle a permis de démontrer son rôle dans le processus de mortalité chez la souris et dans l'attachement du pathogène au niveau des cellules épithéliales humaines [153]. De la même façon, l'implication du flagelle dans la pathogénicité a également été démontrée chez *V. anguillarum* par des techniques de mutagenèse dirigée : des mutants non mobiles générés par transposition et testés pour leur virulence in vivo ne présentaient plus de virulence par balnéation [154]. Enfin, le flagelle semble constituer chez les

Vibrio un facteur de virulence de type accessoire, dont le rôle reste parfois difficile à démontrer compte tenu des phénomènes de « compensation de virulence » observés chez certains mutants dépourvus de flagelle chez *V. cholerae* [155].

- Les pili

La première étape du processus de colonisation repose sur l'adhérence à une cellule cible de l'hôte. De nombreuses bactéries Gram négatif possèdent des appendices de surface plus courts et plus fins que le flagelle, appelés pili dont on peut distinguer deux types : les pili communs et les pili sexuels. Ces pili arbitrent les interactions entre les bactéries entre elles, l'hôte et l'environnement. Alors que les pili sexuels participent à la conjugaison et permet l'échange de matériel génétique entre deux bactéries, les pili communs, plus nombreux, permettent la fixation des bactéries sur les surfaces de l'hôte, conditionnant ainsi leur pouvoir pathogène. Disposés régulièrement à la surface de la bactérie, les pili communs sont des structures protéiques filamenteuses constituées par la polymérisation d'une même sous-unité protéique, la piline, assemblée à des polypeptides mineurs comme l'adhésine. L'adhésine peut interagir avec des récepteurs, de type glycoprotéine ou glycolipide, présents à la surface des cellules hôtes.

Le pilus de type IV a été largement décrit comme étant impliqué dans l'adhérence, la formation de biofilms et dans la mobilité [156]. Par ailleurs, trois différents types de pili ont été identifiés chez *V. cholerae* et associés à la pathogénicité des sérogroupes. Le Toxin-Coregulated Pilus (TCP) est un facteur de virulence majeur dans le processus infectieux de *V. cholerae* [157, 47] : indispensable à la colonisation du tractus intestinal de l'homme (Figure 1.11) [158], le TCP sert également de récepteur au bactériophage filamenteux CTX Φ dont le génome code entre autre la toxine cholérique. Quinze gènes regroupés sur un îlot de pathogénicité appelé VPI (39.5kpb) et caractéristique des souches de *V. cholerae* à l'origine d'épidémies et de pandémies, contrôlent la biosynthèse de ce pilus. Le pilus mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) semble jouer également un rôle, bien que mineur, dans la virulence [159]. D'autres gènes codant des facteurs d'adhésion ont été décrits, les cep (Core-encoded pili), acf (accessory colonisation factor) et *ompU* (outer membrane protein) [160]. De même, l'implication du pilus dans la pathogénicité de *V. vulnificus* a été démontrée par

mutation des gènes *pilD* et *pilA* induisant notamment une diminution de l'adhérence aux cellules épithéliales [161], [162].

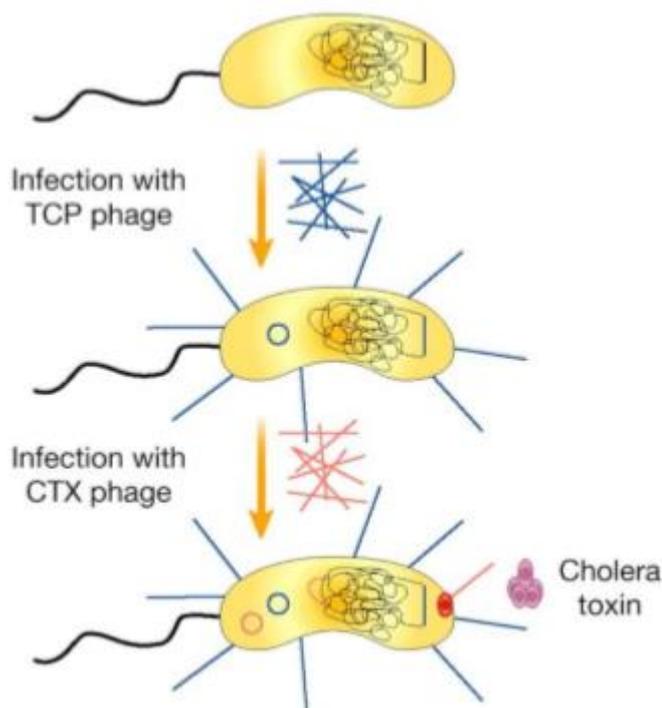


Figure 1.11 : Description du rôle du TCP (Toxin corregulated pilus) de *V. cholerae*, un exemple de pilus de type IV [163].

Le phage TCP infecte *V. cholerae* et sert ensuite de point de fixation du phage *CTX* nécessaire à son entrée dans la bactérie. *V. cholerae* doit donc être dans un premier temps infecté par le phage TCP pour ensuite être infecté par le phage *CTX*.

- Les enzymes hydrolytiques

Outre sa capacité à coloniser et à adhérer aux surfaces de l'hôte, le pouvoir pathogène d'une bactérie tient également à son aptitude à envahir son hôte. Pour cela, de nombreuses bactéries pathogènes excrètent différentes protéines extracellulaires regroupées sous le terme d'invasines. Ces enzymes hydrolytiques présentent différentes fonctions facilitant l'approvisionnement de la bactérie en ressource carbonée et azotée, la dégradation de la matrice extracellulaire et donc de l'organisation tissulaire au moment de l'invasion, mais aussi modulant les réactions de défense de l'hôte et les mécanismes d'échappement. Le terme générique d'invasines regroupe classiquement les enzymes agissant à faible distance du siège de la

multiplication cellulaire et ne provoquant pas la lyse cellulaire, les distinguant alors de certaines toxines extracellulaires.

Depuis une trentaine d'années, une grande variété d'enzymes hydrolytiques a été décrite chez de nombreuses espèces de *Vibrio*, incluant notamment des protéases, des lipases, des nucléases et des hyaluronidases et souvent associée à la virulence des agents pathogènes. Les métalloprotéases sont des enzymes protéolytiques dont l'activité catalytique nécessite un ion métallique. Il s'agit d'endo- ou d'exopeptidases, zinc-dépendantes pour la plupart, qui clivent des peptides ou des protéines de façon plus ou moins spécifique.

L'implication des métalloprotéases dans la virulence des bactéries du genre *Vibrio* fait l'objet d'un intérêt marqué, comme l'atteste le nombre croissant des publications sur le sujet. Différents travaux ont ainsi établi que les métalloprotéases exercent des effets pathologiques variés. En plus de leur pouvoir protéolytique via la dégradation d'une grande variété de substrats protéiques de l'hôte, comme la lactoferrine, le collagène, l'élastine, les protéines plasmatiques, ou encore l'albumine, les métalloprotéases entraînent l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le déclenchement de réactions hémorragiques liées à la stimulation du système kallikreine-kinine, l'hémagglutination des érythrocytes et l'induction de nécroses tissulaires [164], [165]. Les différentes métalloprotéases sécrétées par des espèces de *Vibrio* ainsi que leurs rôles biologiques dans la virulence sont référencées dans le tableau 1.4 [166].

Tableau 1.4 : Rôle biologiques de métalloprotéases décrites chez le genre *Vibrio*[166].

Espèces	Métalloprotéase (désignation)	Rôle dans la virulence	Références
<i>V. cholerae</i>	PrtV	- Effet cytotoxique sur des lignées épithéliales intestinales humaines - Dégradation des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le fibrinogène	(Vaitkevicius <i>et al.</i> , 2008)
	nd	- Dégradation du mucus épithélium chez la souris (<i>in situ</i>)	(Crowther <i>et al.</i> , 1987)
	HA/protease	- Changement morphologique des cellules épithéliales - Altération des filaments d'actine et des protéines des jonctions serrées	(Wu <i>et al.</i> , 1996)
<i>V. mimicus</i>	VMP	- Hémagglutination des érythrocytes	(Chowdhury <i>et al.</i> , 1990)
	VMC	- Cytotoxicité sur les cellules de poissons - Dégradation de collagènes	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
<i>V. pelagius</i>	nd	- Effets toxiques envers le poisson (turbot) - Hémorragie externe au niveau des nageoires, la bouche et des pétéchies dans les organes internes	(Farto <i>et al.</i> , 2002)
<i>V. harveyi</i>	Pap6	- Dégradation d'un ensemble de protéines structurales y compris la gélatine, la fibronectine et le collagène de type IV	(Teo <i>et al.</i> , 2003b)
<i>V. anguillarum</i>	Pa	- Implication dans l'invasion	(Norqvist <i>et al.</i> , 1990)
	EmpA	- Effet toxique sur le poisson (turbot) - Implication dans la motilité et dans l'activité hémolytique	(Han <i>et al.</i> , 2011)

<i>V. splendidus</i>	Vsm	- Effet toxique par injection à des huîtres creuse et cytotoxique sur des lignées cellulaires	(Binesse <i>et al.</i> , 2008)
<i>V. tubiashü</i>	hémagglutinine/ protéase	- Agglutination des érythrocytes d'origine humaine et animale	(Delston <i>et al.</i> , 2003)
	VtpA et VtpB	- Effet toxique par baignade sur des larves d'huître creuse	(Hasegawa & Häse, 2009b; Hasegawa <i>et al.</i> , 2009)
<i>V. aestuarianus</i>	Vsm	- Effet létal sur les huîtres du Pacifique et effet cytotoxique sur leurs hémocytes	(Labreuche <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. vulnificus</i>	VVP	- Dégradation de l'élastine, le fibrinogène et des inhibiteurs protéasiques du plasma - Dommages tissulaires - Lésions hémorragiques	(Shinoda, 2005)
<i>V. parahaemolyticus</i>	VPPC	- Dégradation du collagène de type I	(Kim <i>et al.</i> , 2002)
	VPM	- Effet cytotoxique sur des cellules de branchies du poisson - Hémorragie au niveau de cavité péritonéale après infections expérimentales des poissons	(Luan <i>et al.</i> , 2007)
	PrtVp	- Faible activité hémolytique	(Lee <i>et al.</i> , 1995)

nd: non déterminé

- Les sidérophores

Il ne fait nul doute que, pour survivre et se multiplier dans l'hôte, les bactéries doivent développer des mécanismes d'approvisionnement en nutriments nécessaires à leur croissance. Le fer en est un élément essentiel et intervient dans de nombreux processus biologiques (régulation de gène ou certaines réactions enzymatiques). Il a été estimé qu'une suspension bactérienne de *E. coli* de l'ordre de 10^9 cellules/ml consommait jusqu'à 10^{18} atomes de fer par litre. Du fait de la solubilité réduite du fer (environ $6 \cdot 10^6$ atomes par litre) et de sa présence sous forme libre limitée à de très faible quantité dans l'environnement, les bactéries ont donc développé des systèmes optimisés d'acquisition du fer : le plus connu est le sidérophore (Figure 1.12). Ces petites molécules de très faible poids moléculaire (<1000 Da) chélatent le fer soluble Fe^{3+} dans l'environnement avec une très haute affinité et peuvent aussi l'extraire de protéines porteuses de l'organisme-hôte, comme la transferrine présente chez les mammifères [167], [168].

Chez les bactéries Gram négatif, les sidérophores chélatés au fer sont internalisés à travers la membrane externe par le biais d'un système multiprotéique transmembranaire complexe qui permet la mise à disposition du fer pour la bactérie. Plus de 500 sidérophores ont été décrits et classés en trois groupes en fonction de la structure chimique du groupe fonctionnel se liant au fer [169].

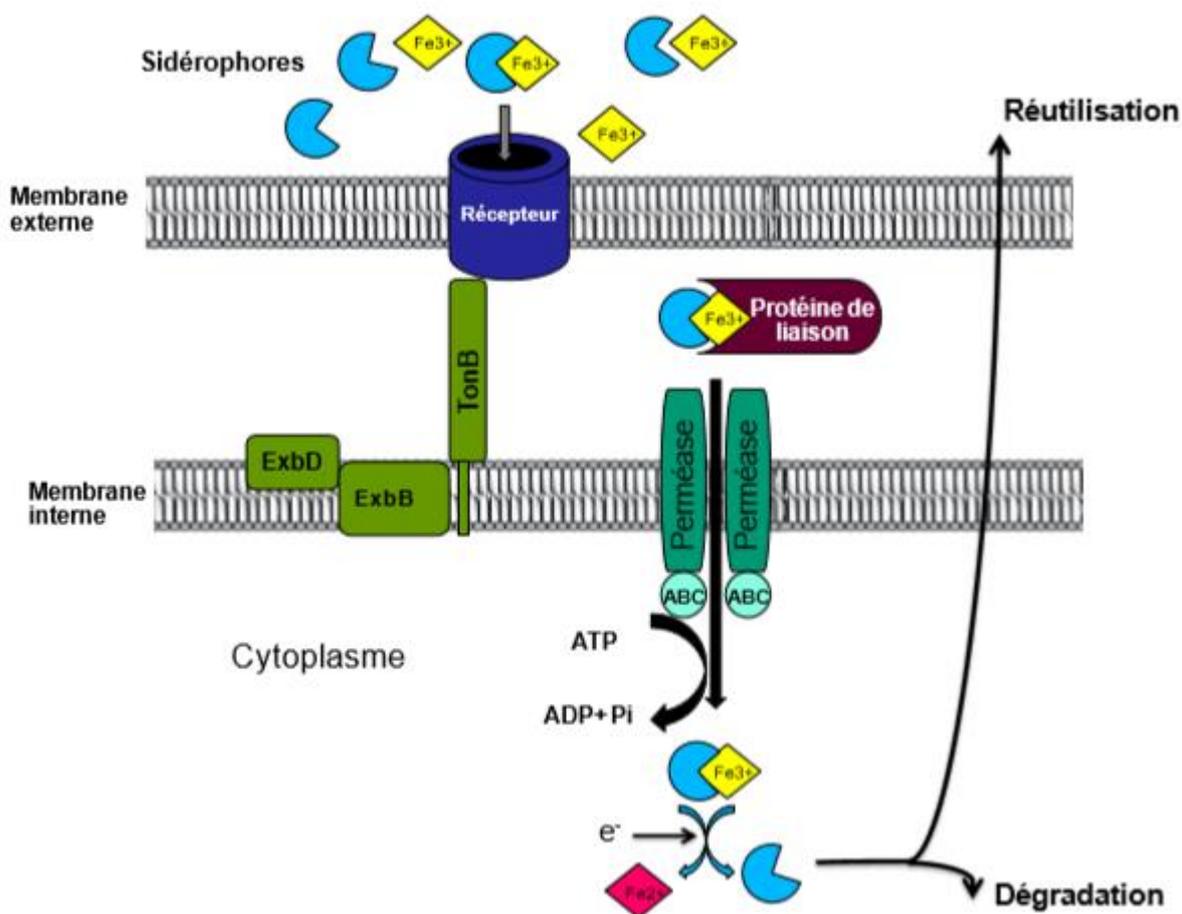


Figure 1.12 : Mécanismes d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négatif [167], [168].

Après la reconnaissance de l'ion Fe³⁺ par les sidérophores, le complexe est transporté à travers la membrane externe par un récepteur spécifique. Ce passage nécessite un transporteur hautement spécifique à chaque sidérophore et un transducteur d'énergie. Dans le cas des bactéries à Gram négatif, l'énergie requise est procurée et transmise par le complexe TonBExbBExbD localisé dans la membrane interne (Figure 12). Des protéines de liaison permettent ensuite le transport du complexe ferri-sidérophore du récepteur à la membrane interne et par suite à travers les perméases via les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) qui utilise l'ATP comme énergie,

où il se dissocie soit par digestion partielle, soit par un processus réductif et libère l'ion Fe²⁺.

De nombreuses espèces de *Vibrio* produisent des sidérophores, comme *V. parahaemolyticus* [170] ou *V. cholerae* [171]. Chez *V. vulnificus*, un sidérophore particulier a été mis en évidence, la vulnibactine [172]. Son rôle dans la virulence a été démontré par l'atténuation du phénotype pathogène chez des mutants ne synthétisant plus la vulnibactine et ne pouvant plus extraire de fer à partir de la transferrine [173]. Chez *V. anguillarum*, le sidérophore, nommé l'anguibactine et codé par un opéron localisé sur le plasmide pJM1, constitue un facteur de virulence majeur [174, 175, 176, 169]. Ce même opéron code le complexe protéique de transport (Complexe FatABCD) permettant l'internalisation de l'anguibactine dans le cytoplasme de la bactérie [177, 178, 179] dont l'implication dans la pathogénicité a été démontrée avec détails [174]. Enfin, il a été observé des phénomènes de compétition entre différents microorganismes pour le captage de sidérophores : certaines bactéries, comme *V. anguillarum*, sont capables d'intercepter les sidérophores d'autres bactéries, comme l'acinétobactine de *Acinetobacter baumannii* afin d'occuper de façon dominante une niche écologique [180].

Une grande diversité de structures a été observée chez les sidérophores produits par les *Vibrio*. Le tableau 1.5 illustre les différents sidérophores sécrétés par le genre *Vibrio*.

Tableau 1.5: Différents sidérophores décrits au sein du genre *Vibrio* [166].

Espèces	Types de sidérophore	Références
<i>V. anguillarum</i>	Anguibactine	(Actis <i>et al.</i> , 1986)
	Vanchrobactine	(Lemos <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. cholerae</i>	Vibriobactine	(Griffiths <i>et al.</i> , 1984)
<i>V. vulnificus</i>	Vulnibactine	(Okujo <i>et al.</i> , 1994)
<i>V. fluvialis</i>	Fluvibactine	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vibrioferine, Ferrichrome, Aerobactine	(Broberg <i>et al.</i> , 2011)
<i>V. hollisae</i> et <i>V. mimicus</i>	Aerobactine	(Okujo & Yamamoto, 1994)
<i>V. harveyi</i>	Sidérophore	(Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012)

b. Les facteurs capables d'altérer l'hôte

- les toxines

En provoquant soit des lésions, soit des dysfonctionnements cellulaires, les facteurs capables d'altérer l'hôte sont principalement composés de toxines. Il existe une grande variété de structure des toxines et une grande diversité dans leurs effets pathologiques rendant les possibilités de classification multiples [181]. On peut cependant distinguer les exotoxines excrétées ou libérées dans le milieu, des endotoxines qui font partie intégrante des corps microbiens.

- Les exotoxines

Les exotoxines sont des protéines bactériennes toxiques excrétées dans le milieu extracellulaire ou libérées après lyse de la bactérie et présentant une activité biologique le plus souvent catalytique et une forte spécificité d'action. Elles sont généralement thermolabiles et sensibles aux agents dénaturants. On distingue classiquement trois types d'exotoxines qui diffèrent selon leur structure et leur mode d'action [182] :

- Les toxines de type AB sont composées de deux modules : l'un se fixe au niveau du récepteur de la cellule hôte et détermine une spécificité d'action et l'autre porte le site catalytique siège de la toxicité. Chez *V. cholerae*, le module B de la toxine CT (Cholera Toxin) se fixe sur un récepteur spécifique, le GM1 ganglioside présent à la surface des entérocytes, et le module A catalyse l'ADP-ribosylation de la protéine G α qui active l'adénylate cyclase de façon permanente et non-contrôlée au niveau du cytoplasme de la cellule eucaryote ciblée (Figure 1.13). L'augmentation d'AMPc intracellulaire consécutive induit une perte de contrôle du flux ionique et conduit à la perte passive d'eau par les cellules, principal symptôme du choléra.

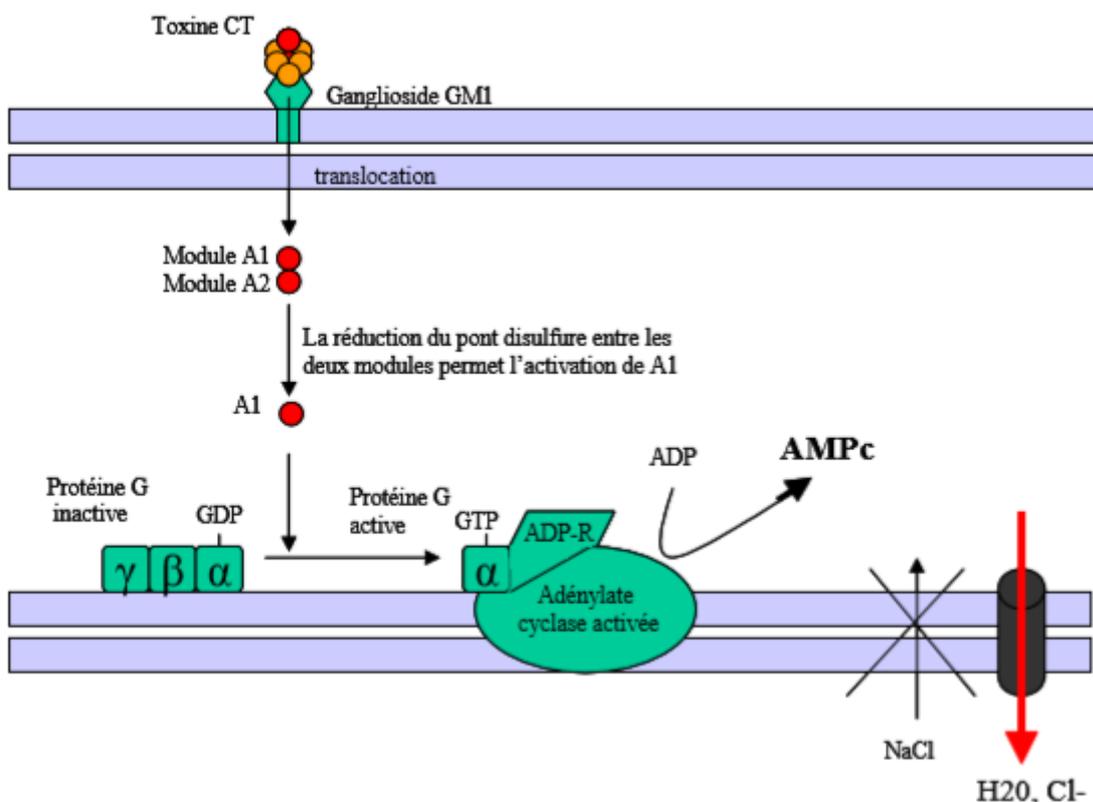


Figure 1.13 : Mode d'action de la toxine cholérique CT [182].

Après fixation au récepteur GM1, la sous-unité A est transloquée dans le cytosol où elle est activée par réduction thiol-dépendante. La sous-unité ainsi tronquée, A1, catalyse l'ADP-ribosylation d'une protéine G. L'activation de l'adénylate cyclase conduit à la libération d'AMPc, messenger intracellulaire ubiquiste. L'AMPc inhibe l'absorption active de NaCl et augmente la sécrétion d'eau et d'ions chlorures.

- Les toxines lytiques, parmi lesquelles les hémolysines sont très répandues chez les *vibrions* pathogènes [183], provoquent la lyse de différents types cellulaires de vertébrés, érythrocytes ou cellules du système immunitaire, leur conférant le nom plus générique de cytolysine [184]. Leur action est caractérisée par la formation de pores au niveau de la membrane plasmique des cellules eucaryotes cibles, induisant la lyse cellulaire et le relargage des protéines transportant le fer (comme l'hémoglobine, la transferrine ou la lactoferrine), des lésions tissulaires ou encore la destruction des cellules du système immunitaire de l'hôte. Chez *V. cholerae*, la plupart des souches non-O1, produisent une toxine cytolytique sécrétée dans le milieu extérieur : la toxine El Tor cytolysine/hémolysine ou HlyA [185]. Cette toxine présente une activité

entérot toxique et apparaît comme la cause principale de la gastroentérite causée par les souches *V. cholerae* non-O1. Chez *V. vulnificus*, une exotoxine de type hémolysine (VvhA) a été identifiée [186]. En plus de son rôle dans la libération du fer de l'hémoglobine et la formation de pores dans la membrane cellulaire, cette toxine provoque des effets cytotoxiques. L'injection intradermique de la VvhA purifiée à des souris a entraîné des dommages au niveau des cellules graisseuses, des cellules endothéliales et des cellules musculaires et des infiltrations inflammatoires modérées. D'autres études ont démontré que la Vvha stimule l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'apoptose des cellules endothéliales et l'hyperproduction de l'oxyde nitrique [74]. De même, chez *V. parahaemolyticus*, une hémolysine thermostable directe (TDH) et une hémolysine apparentée à la TDH (TRH) ont été décrites [187]. Ces deux toxines possèdent une activité de type entérot toxique, cardiotoxique et cytotoxique [85]. Chez *V. harveyi*, l'hémolysine (VHH) de type phospholipase a montré une cytotoxicité contre des cellules de poisson et une forte pathogénicité envers le poisson flet (poisson plat) par injection qui s'est manifestée par des hémorragies au niveau de la cavité péritonéale et la formation des zones nécrotiques à l'endroit de l'injection [188]. En plus, la VHH a provoqué des changements structuraux et une induction de l'apoptose chez les cellules de flet [189]. Chez *V. anguillarum*, quatre hémolysines ont été identifiées VAH 2, VAH 3, VAH 4 et VAH 5 [190]. Les hémolysines purifiées ont montré des activités hémolytiques contre les érythrocytes de poissons, de moutons et de lapins. Les souches mutées à un seul gène des quatre ont été trouvées moins virulentes que la souche sauvage envers les truites (*Oncorhynchus mykiss*), indiquant ainsi que chaque gène d'hémolysine contribue à la virulence de *V. anguillarum*. Une hémolysine Vh-rTDH produite par *V. hollisae*, similaire à l'hémolysine TDH de *V. parahaemolyticus*, a été identifiée. Cette toxine a montré des activités cytolytiques envers plusieurs types d'érythrocytes animales [191]. Enfin, chez *V. tubiashii*, une cytolytine similaire à celle de *Vibrio vulnificus* capable de lyser plusieurs types de cellules et des érythrocytes a été décrite [192].

- Les toxines injectées : certaines toxines protéiques et cytotoxiques sont injectées directement dans les cellules hôtes par le biais de systèmes de sécrétion complexes provoquant une perturbation des processus cellulaires et une lyse des cellules de défense, l'action de ces toxines permet un échappement au système immunitaire de l'hôte. Le système de sécrétion de type III (ou SSTT), un des plus complexes décrit à ce jour et nécessitant l'expression de plus de 20 gènes [193], [194], permet la sécrétion

et la translocation de facteurs de virulence dans le cytosol des cellules eucaryotes cibles (Figure 1.14) [195], [196], [197]. Ce système de sécrétion est commun à de nombreuses bactéries Gram négatif, comme les espèces *Yersinia spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp* ainsi que les *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques. Le séquençage complet d'une souche de *V. parahaemolyticus* a permis de mettre en évidence deux opérons codant deux TTSS : l'un, le SSTT1, est impliqué in vitro dans la cytotoxicité alors que l'autre, le SSTT2 retrouvé dans les souches pathogènes pour l'homme, est responsable d'une activité entérotoxique induisant une accumulation de fluide intestinal. Des opérons codant des SSTT ont été identifiés chez diverses souches de *Vibrio* comme *V. cholerae* et *V. harveyi* [198], [199], tandis que des gènes homologues au SSTT ont été mis en évidence chez *V. alginolyticus* et *V. tubiashii* [200]. Enfin, un nouveau système de sécrétion de type IV a été décrit chez *V. cholerae* et serait responsable de la défense de *V. cholerae* contre des prédateurs eucaryotes comme l'amibe *Dictyostelium discoideum* [201].

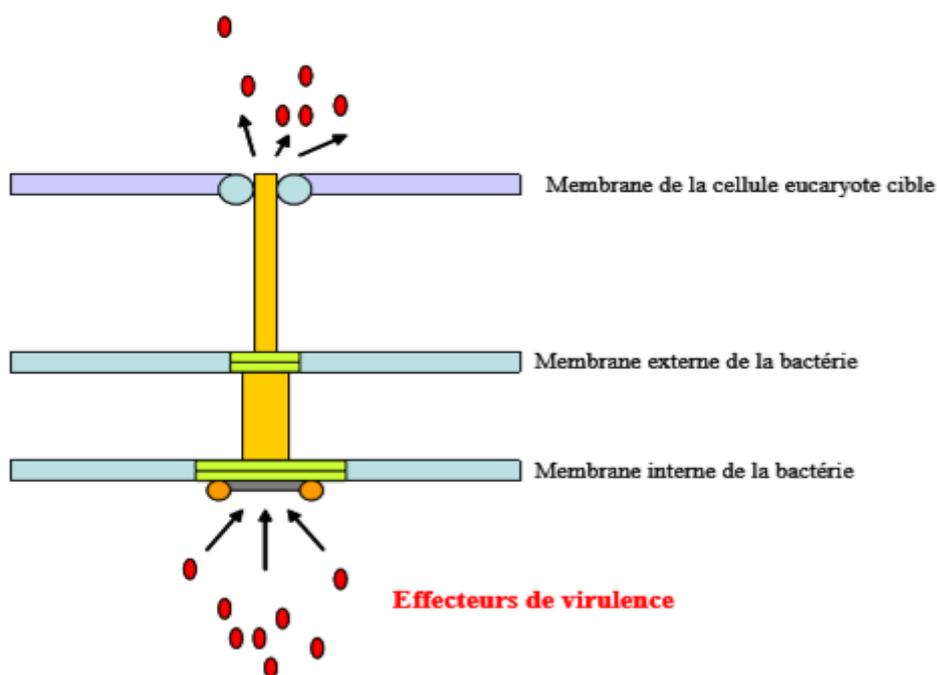


Figure 1.14 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SSTT) [182].

- Les endotoxines

Les endotoxines regroupent les composés toxiques structuraux de la paroi des bactéries Gram négatif, appelés lipopolysaccharides ou LPS. Composant de la membrane externe, le LPS est constitué de trois parties :

1. le lipide A est responsable de la toxicité du LPS et de ses capacités immunomodulatrices,
2. le polysaccharide central ou « core » maintient la membrane externe
3. la chaîne latérale O hydrophile est exposée au milieu extérieur et présente une grande variabilité à l'origine de la spécificité sérologique (Figure 1.15) [202], [203].

Le LPS devient toxique après la lyse cellulaire de la bactérie provoquée par la réponse immunitaire de l'hôte ou par un traitement antibiotique. Ce choc endotoxique induit par la libération massive des LPS, entraîne leur relargage dans le système circulatoire, où ils se fixent à une protéine de type LBP (LPS binding protein). Le complexe LPS/LBP, reconnu par différents récepteurs présents à la surface des macrophages (de la famille des Toll), provoque l'activation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor κ B) qui induit une production massive de cytokines proinflammatoires. La toxicité des LPS repose donc sur leur capacité à induire l'apoptose de la cellule hôte [204] mais également, une sur-stimulation du système immunitaire donnant lieu à un choc septique, caractérisé par des symptômes tels que oedèmes tissulaires, fièvre, hémorragies et hypotension (comme décrit chez *V. vulnificus*). Chez *V. cholerae*, d'autres composés structuraux, les porines OmpU et OmpT ont été associés à la virulence [205], [206].

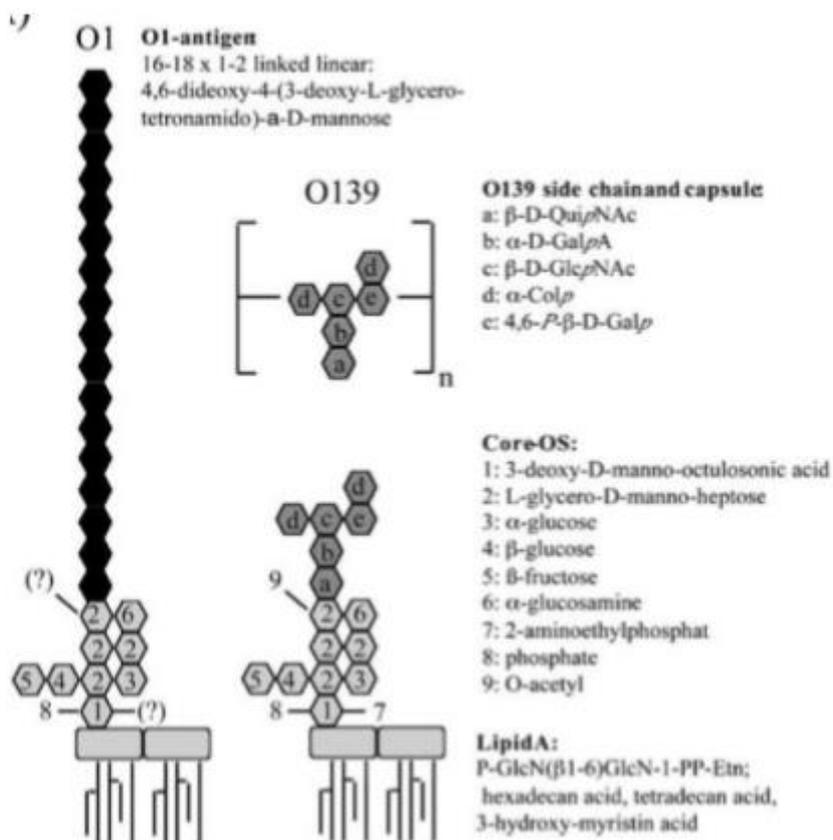


Figure 1.15 : Structure des LPS et de la capsule des sérogroupes O1 et O139 de *V. cholerae*. Le lipide A et le core sont identiques pour les deux sérogroupes. Les quelques différences chimiques sont indiquées par « ? » [202].

Il a pu être montré récemment que les LPS, tout comme les protéines de capsule et les OMP (Outer Membrane Protein) interagissent avec le système immunitaire inné de l'hôte au travers de motifs conservés désignés sous le terme générique de MAMPs pour "microbe-associated molecular patterns", ou PAMPs pour "pathogen-associated molecular patterns". En effet les MAMPs ou PAMPs sont reconnus par les PRRs ou "Pattern recognition receptors" de l'hôte et ces interactions conduisent à l'activation des mécanismes de défenses de celui-ci [207]. Ainsi de nombreuses études visant l'étude de la modulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte ont permis de les mettre en évidence et de les classer d'un point de vue moléculaire ; ces MAMPs ou PAMPs sont également utilisés par injection expérimentale dans l'hôte en tant qu'inducteurs potentiels des réactions de défenses [208], [209], [210], [211], [212].

c. Les facteurs d'échappement au système immunitaire de l'hôte.

Même si les invertébrés comme *Caenorhabditis elegans* [213], *Drosophila melanogaster* [214], [215] ou *Manduca sexta* [216] restent les modèles d'interactions bactéries-hémocytes les plus documentés à ce jour, différents travaux portant sur les interactions hémocytes de mollusques/*vibrions* ont mis en évidence quelques stratégies employées par ces bactéries et leurs produits extracellulaires pour échapper au système immunitaire.

- Altération des défenses cellulaires de l'hôte

Des modifications morphologiques des hémocytes, et notamment un arrondissement de ces cellules, ont été observés par microscopie chez la moule *Mytilus edulis* en présence de *V. alginolyticus* NCMB 1339, de *V. anguillarum* ou de son surnageant de culture [217], [218]. Ces mêmes modifications morphologiques ont également été observées sur les hémocytes de palourdes (*Ruditapes philippinarum*) en présence de *V. tapetis* [219], [220] ainsi que chez *Mya arenaria* en présence de *V. splendidus* [221], et associées à une inhibition de leur capacité d'adhésion. Enfin, l'exposition des hémocytes de *C. gigas* aux produits extracellulaires de *V. aestuarianus* 01/032 entraîne également une inhibition dose-dépendante des capacités d'adhésion, un arrondissement et une agrégation des cellules hémocytaires ainsi qu'une perte de leurs extensions cytoplasmiques [222].

- L'internalisation dans des cellules non phagocytaires

Cette stratégie qui garantit une niche écologique protégée où la bactérie peut persister et se répliquer a été mise en évidence chez des souches de *V. hollisae* [223] et *V. parahaemolyticus* [224] qui induisaient leur internalisation dans des lignées de cellules humaines grâce à des remaniements du cytosquelette.

- La capsule

Afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte, certaines bactéries sécrètent une capsule généralement constituée de polysaccharides peu solubles s'accumulant autour de la paroi (CPS). La biosynthèse de la capsule est déterminée par des facteurs génétiques et environnementaux. Barrière de perméabilité, cette capsule présente différentes fonctions : elle intervient dans la prévention de la dessiccation favorisant la

transmission et la survie dans une niche écologique mais également dans la résistance à l'immunité non-spécifique et notamment aux mécanismes microbicides « post-internalisation » déclenchés au cours de la phagocytose entraînant une baisse de l'efficacité de cette réponse de l'hôte. Chez les pathogènes de vertébrés, la CPS peut être impliquée dans la résistance à l'immunité spécifique car les bactéries encapsulées sont moins immunogènes [225]. Chez *V. vulnificus*, l'encapsulation a été clairement associée à la virulence et en constitue le déterminant majeur : une mutation au niveau de l'opéron codant la CPS entraîne une diminution significative de la virulence [226] et une sensibilité des mutants à l'activité bactéricide du sérum humain [227]. Par ailleurs, l'expression de la CPS inhiberait la constitution du biofilm bactérien [228]. Chez *V. cholerae*, l'opéron wbf codant le sérotype O139 pathogène à l'origine d'épidémies, code également une capsule polysaccharidique impliquée dans les mécanismes de colonisation [229], [230].

- Inhibition de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) et production d'enzymes antioxydantes

Une autre stratégie élaborée pour échapper à la destruction par les phagocytes consiste à bloquer la synthèse des composés toxiques hématocytaires et/ou produire des enzymes antioxydantes. Une superoxyde dismutase produite par *V. shiloi* permet à cette bactérie de résister à ces composés microbicides [231], tout comme la catalase sécrétée par *Listonella* (= *Vibrio*) *anguillarum* qui détoxifie les ROS produites par les hématocytes de *C. virginica* [232]. De plus, *V. pectinivora* pathogène des larves de la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* est capable d'inhiber la production d'espèces oxygénées réactives [233], [234]. Enfin, plus récemment, des travaux portant sur l'évolution de la production de ROS et de l'expression de l'enzyme Cg-EcSOD au niveau des hématocytes de *C. gigas* au cours d'une infection expérimentale à *V. aestuarianus* ont mis en évidence, dès le début de l'infection, une dérégulation du métabolisme oxydatif caractérisée par une stimulation de la production de ROS chez les hématocytes d'animaux injectés, concomitante à une diminution des niveaux de transcrits d'un gène codant une superoxyde dismutase Cg-EcSOD [235]. Ce stress oxydatif des cellules de défense de l'hôte pourrait correspondre à un mécanisme de virulence spécifique de *V. aestuarianus*, lui permettant d'altérer les fonctions immunitaires de l'huître et la viabilité des hématocytes [236].

- Régulation de l'expression des facteurs de virulence

Les bactéries ont la capacité de développer plusieurs stratégies ou «style de vie», de réguler l'expression et la sécrétion de leurs facteurs de virulence et de s'adapter aux variabilités de l'environnement extérieur comme la variation de la salinité, la température et la disponibilité et la qualité des nutriments. Il a été rapporté que certaines bactéries comme *V. vulnificus* et *V. cholerae* peuvent survivre dans des conditions environnementales dures pour des périodes de temps prolongées dans un état viable métaboliquement mais non cultivable (pas de formation de colonies) désigné par VBNC pour «Viable But Non-Culturable», ABNC pour «Active But Not cultivable» et CVEC pour «Conditionally Viable Environmental Cells» [237], [238]. Suite au changement climatique, les bactéries restaurent leur état cultivable à l'aide des facteurs dépendants sécrétés par d'autres bactéries environnantes et plus précisément les acteurs du quorum sensing (QS) qui prennent le relais pour déclencher de nouveau la virulence des bactéries en état CVEC [239]. La figure 1.16 schématise la formation du CVEC et le phénomène de leur ressuscitation par le biais du QS.

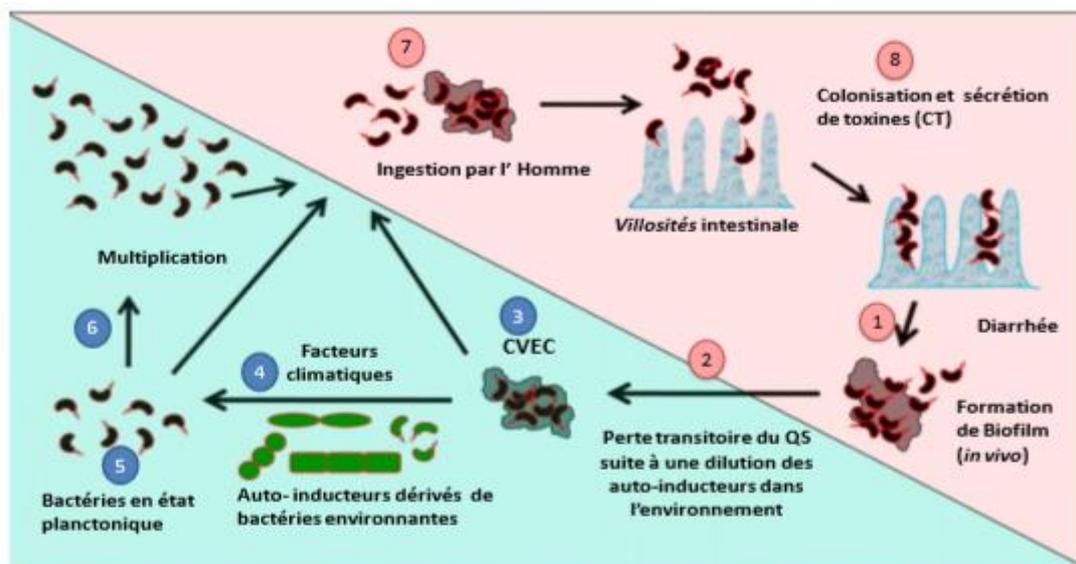


Figure 1.16 : Le phénomène de la formation de CEVC et leur ressuscitation chez *V. cholerae* [239].

- Quorum sensing (QS).

D'une manière générique, le Quorum Sensing est un processus de communication entre les bactéries impliquant des molécules appelées les auto-inducteurs qui contrôlent la production de plusieurs facteurs de virulence. Ces derniers sont de petites molécules qui régulent habituellement l'expression de certains gènes bactériens en réponse à une densité cellulaire ou à des interactions interspécifiques entre les bactéries. On distingue des autoinducteurs de nature peptidique pour les bactéries à Gram+ et des dérivés d'acides gras pour les bactéries à Gram-. L'espèce *V. harveyi* est la bactérie la plus étudiée pour son système de quorum sensing. Selon NATRAH et al.:[240], le système majeur de régulation (positif ou négatif) de l'expression des facteurs de virulence extracellulaires chez *V. harveyi*. Ce système régule positivement l'activité gélatinase et caséinase et régule négativement l'activité phospholipase. Des travaux ont dévoilé qu'à haute densité cellulaire, le QS réprime l'expression du système de type III chez *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus* [198]. La figure 1.17 représente l'implication du QS sur l'expression de quelques facteurs de virulence chez *V. harveyi*.

Chez *V. cholerae*, le QS est impliqué dans la formation du biofilm [241] et le renforcement de sa capacité à coloniser [242].

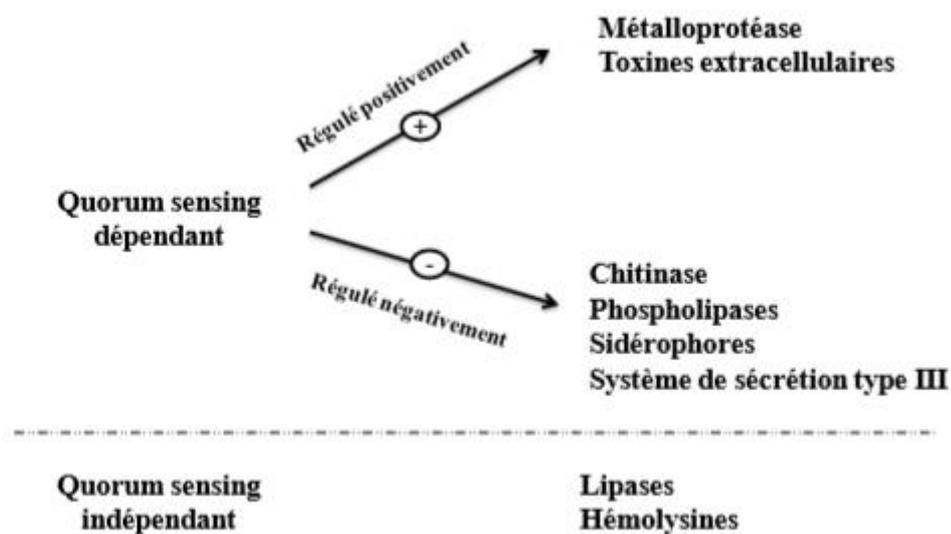


Figure 1.17 : Impact du quorum sensing sur l'expression des facteurs de virulence chez *V. harveyi* [240].

Il faut noter qu'il existe d'autres facteurs de virulence qui ne sont pas régulés par le QS comme les hémolysines et les lipases [240]. De plus, même si la perturbation de la communication intracellulaire pourrait constituer une stratégie pour lutter contre les

infections dans le domaine de l'aquaculture [243] il ne faut pas nier que dans le domaine médical malgré la perte du QS, certaines bactéries sont capables de provoquer des infections [244].

1.6. Méthodes de détection du genre *Vibrio*

La détection des espèces au sein du genre *Vibrio* a été toujours basée sur des techniques phénotypiques traditionnelles [245] et plus récemment sur des outils innovants de biologie moléculaire [246], [247], [248], [249].

En général, les méthodes classiques d'identification bactérienne nécessitent plusieurs étapes : commençant par l'isolement, l'enrichissement, l'étalement sur milieux sélectif, suivis de caractérisation, d'observation morphologique et finissant par des analyses biochimiques. Cependant, toute cette procédure traditionnelle de détection bactérienne reste lente, laborieuse et nécessite souvent plusieurs jours pour sa réalisation. En plus, certains tests phénotypiques sont insensibles pour la détection des bactéries à faible concentration ou qui présentent des profils phénotypiques inhabituels. La variabilité des caractères biochimiques atypiques des souches de *Vibrio* isolées de l'environnement rend leur identification et leur distinction difficile. Les résultats de VANDENBERGHE et al.; [245] ont montré les limites des tests biochimiques dans l'identification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* isolées à partir de différents systèmes d'aquaculture dans de nombreux pays. En outre, certaines bactéries peuvent subir des lésions ou être dans des états de dormance, à cause des conditions de stress ou des changements défavorables comme la variation de la salinité, le changement de la température ou la carence en quelques éléments nutritifs, et deviennent non détectables par les méthodes bactériologiques classiques [250], [251], [252].

Les progrès spectaculaires de diverses technologies moléculaires dans la discipline de microbiologie ont permis le développement des outils d'identification plus fiables, rapides, sensibles et spécifiques pour la détection des bactéries même à très faible concentration cellulaire dans leur environnement naturel. Les outils les plus utilisés sont la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) et outils dérivés : la qPCR (PCR en temps réel), l'AFLP (le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés), la FISH (l'hybridation fluorescente in situ), la MLEE (électrophorèse enzymatique

multilocus), la RFLP (Polymorphisme de taille des fragments de restriction) et la Ribotypie [237].

La PCR a été souvent utilisée pour identifier des espèces du genre *Vibrio*, déterminer leurs relations phylogénétiques et taxonomiques et rechercher des gènes codant pour des facteurs de virulence par le biais de plusieurs cibles moléculaires. En visant une région variable de l'ARNr 16S, la PCR a été utilisée pour la détection et la différenciation de *V. vulnificus* dans les milieux marins [246]. Egalement, la PCR a été utilisée pour détecter *V. parahaemolyticus*, en ciblant plusieurs gènes de virulence comme *toxR* ou les deux hémolysines TDH et TRH [253], [254]. De même, la *V. cholerae*, est systématiquement recherchés par PCR à travers les gènes *ctxA* et *ctxB*, codant pour la toxine cholérique [255]. La technique dz multiplexe PCR a été aussi employée pour détecter le genre *Vibrio* [256], [257], [249].

La méthode qPCR a été développée récemment pour détecter et quantifier des espèces de *Vibrio* en ciblant différents gènes éventuellement impliqués dans la virulence de l'espèce. La qPCR a été utilisée pour la détection de *V. aestuarianus* [258] et *V. tubiashii* [248] durant les épisodes de mortalités de l'huître creuse *C. gigas*. Aussi, cet outil a été utilisé pour détecter et quantifier *V. cholerae* dans l'eau et les produits de la pêche [259]. Cependant, cette technique exige un niveau élevé de compétence en laboratoire et un matériel onéreux non compatible à une utilisation directe par exemple sur site.

Des méthodes sérologiques ont été aussi utilisées avec succès pour l'identification des espèces de *Vibrio* dans les aliments et les environnements aquatiques. La méthode ELISA est le test immunologique le plus utilisé [237], [52]. Récemment, Gharaibeh et ses collaborateurs [260] ont développé un test ELISA et un test immunologique à flux latéral (test de jauge) pour la détection de la métalloprotéase à zinc sécrétée par la souche *V. tubiashii*. Ces deux outils s'appuient sur la spécificité des anticorps monoclonaux qui reconnaissent des épitopes spécifiques de la métalloprotéase VtpA mature.

CHAPITRE 2

PARTIE EXPERIMENTALE

2.1. INTRODUCTION

Les *vibrions* (espèces bactériennes du genre *Vibrio*) considérés aujourd'hui comme pathogènes émergents qui sont impliquées dans les infections d'origine animale chez l'homme après ingestion de produits de mer contaminés. En effet, depuis quelques années, l'incidence des infections à *Vibrio* est en constante et régulière progression dans le monde [261].

Par ailleurs, peu d'études ont été réalisées dans notre pays afin de mieux estimer la prévalence des vibrions pathogènes dans les produits de la pêche [262], [263]. De telles études sont importantes parce qu'elles permettent d'évaluer les risques dû à ces pathogènes et la mise en place des mesures préventives pour la maîtrise des dangers sanitaires liés à la consommation des produits de la pêche. C'est dans ce sens que s'inscrit la présente étude qui se fixe comme objectif d'évaluer la prévalence de pathogènes émergents de type *vibrio* dans les produits de la mer en Algérie.

Les objectifs spécifiques sont :

- L'évaluation de la qualité hygiénique des produits de la mer par la recherche microbiologique et moléculaire des vibrions présumés pathogènes dans les poissons et dans les moules.
- caractériser les isolats de *Vibrio* isolées par des techniques moléculaires appliquées à la recherche des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité.
- La distribution des différentes espèces de *Vibrio* en fonction des produits de la mer analysés (élevage ou sauvage).
- Déterminer l'Influence de la saisonnalité sur le développement de ces germes.

2.2. LA RECHERCHE DES *VIBRIO* DANS LES POISSONS

2.2.1. Description des sites d'étude

L'étude a été menée dans une région centre de la côte méditerranéenne algérienne, au niveau de trois zones de production halieutique :

- La zone de Boumerdes

Dans la wilaya de Boumerdes, les échantillons de loup de mer et la dorade royale d'élevage ont été prélevés à partir de deux fermes piscicoles :

a- La pisciculture ONDPA de Cap Djinet (Figure 2.1) (36.848622, 3.692855) qui est une ferme d'élevage marin de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) et de la dorade royale (*Sparus aurata*) dans des bassins sous mode intensif. Cette ferme se trouve à 3km au sud-ouest de la ville de cap Djinet, elle est située à 77km d'Alger et à 30km à l'est de la wilaya de Boumerdes. A proximité de cette ferme se trouve une centrale thermique qui rejette de l'eau chaude, ce qui implique qu'à une période de l'été, l'eau devient trop chaude et commence à avoir un impact positif sur la croissance des germes.



Figure 2.1 : Localisation géographique de la ferme de cap djinet. (Google earth, 2019).

b- La ferme Hypone Aquacole de Zammouri (Figure 2.2) (36.782270, 3.557132), installée à environ 3 kilomètres à l'ouest du port de Zemmouri et à environ 2 000

mètres du rivage de la plage de Zemmouri El Bahri. Elle est spécialisée dans l'élevage de la daurade royale sous mode semi-intensif dans des cages flottantes en mer.

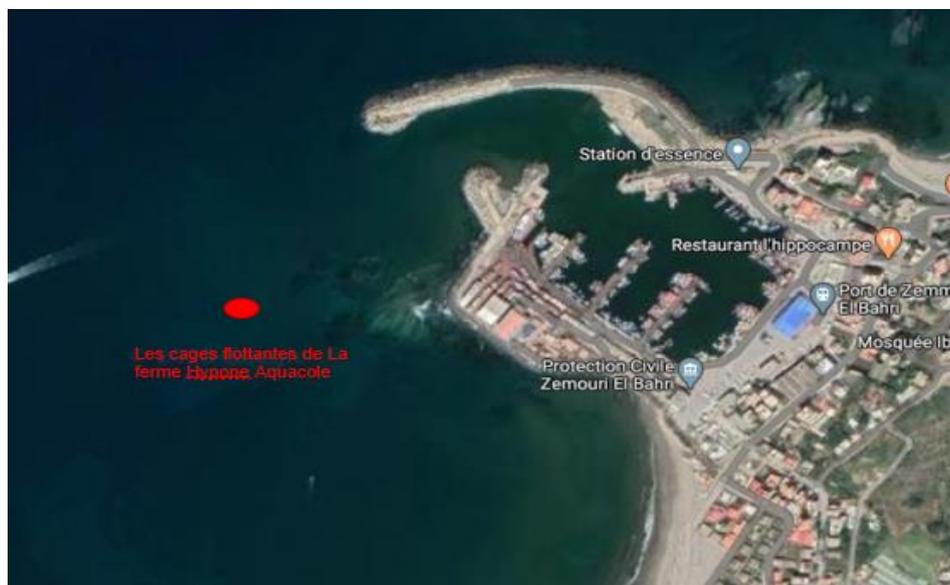


Figure 2.2 : Localisation géographique de la Ferme de Zemmouri El Bahri. (Google earth, 2019).

Les échantillons de loup de mer et la dorade royale sauvages ont été achetés au niveau de la pêcherie de Cap djinet, le port de Zemmouri El Bahri et la poissonnerie de Figuier.

- La zone d'Azeffoun

Les échantillons de loup de mer et la dorade royale d'élevage ont été prélevés à partir de d'une seule ferme piscicole :

La ferme aquacole de M'lata (Figure 2.3) (36.893402, 4.350627), située à 70 Km au nord-est de la wilaya de Tizi ousou, dans la daïra d'Azeffoun. Elle est spécialisée dans l'élevage du loup de mer et de la daurade royale sous mode semi-intensif dans des cages flottantes en mer. Elle reçoit les eaux de l'Oued de Irzer de M'lata qui communique avec la mer par un petit plan d'eau.



Figure 2.3: Localisation géographique de la ferme de M'LATA, Azzefoune. (Google earth, 2019).

Les échantillons de loup de mer et de la dorade royale sauvages ont été achetés du port de pêche d'Azzefoun.

- La zone de Tipaza

Les échantillons de loup de mer et la dorade royale d'élevage ont été prélevés à partir de d'une seule ferme piscicole :

Le site aquacole SARL E.A.M est un élevage piscicole de loup de mer (*Discentrarcus labrax*) et la daurade royale (*Sparus aurata*) en cages flottantes (Figure 2.4) (36.611645, 2.624503), qui se situe à Ain Tagourait au Nord-est de la willaya de Tipaza, environ 15 Km à l'Est de Tipaza.

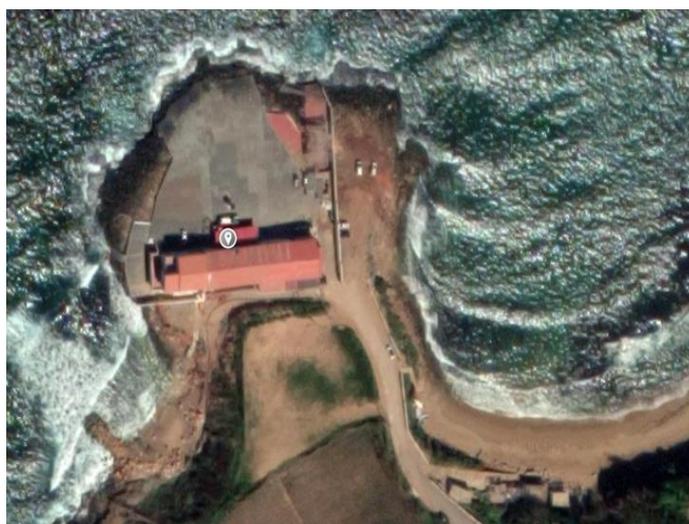


Figure 2.4: Localisation géographique de la ferme aquacole de Ain Tagourait. (Google earth, 2019).

Les échantillons de loup de mer et de la dorade royale sauvages ont été achetés du port de pêche de Bouharoun.

2.2.2. Matériel et méthodes

2.2.2.1. Matériel

Le matériel utilisé pour les analyses effectuées sur les prélèvements est le matériel classique conforme à la norme ISO 7218 :2007 de microbiologie alimentaire [264] (APPENDICE B).

2.2.2.2. Echantillonnage

L'étude a été menée dans une région centre de la côte méditerranéenne algérienne, sur une période de deux ans.

Un total de 690 échantillons de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) et de la dorade royale (*Sparus aurata*) ont été prélevés mensuellement de janvier 2017 à décembre 2018 au niveau de trois zones de production halieutique (Tableau 2.1, 2.2 et 2.3) (Fig. 2.5):

- Dans la wilaya de Boumerdes, 260 échantillons de loup de mer et de la dorade royale d'élevage ont été collectés à partir de la pisciculture ONDPA de Cap Djinet (Figure 2.1), 80 échantillons de la daurade royale d'élevage ont été collectés à partir de la ferme Hypone Aquacole de Zammouri (Figure 2.1), et 80 échantillons de loup de mer et de la dorade royale sauvage ont été achetés au niveau de la pêcherie de Cap djinet, le port de Zemmouri El Bahri et la poissonnerie de Figuier.

- Dans la région d'Azeffoun, 40 échantillons de loup de mer et de la dorade royale d'élevage ont été prélevés au niveau de la ferme aquacole de M'lata (Figure 2.3) et 20 échantillons de loup de mer et de la dorade royale sauvage ont été achetés du port de pêche d'Azeffoun.

- Dans la wilaya de Tipaza, 150 échantillons de loup de mer et de la dorade royale d'élevage ont été collectés à partir de l'élevage piscicole SARL E.A.M de Ain Tagourait et 60 échantillons de loup de mer et de la dorade royale sauvage ont été achetés du port de pêche de Bou haroun.

La répartition des échantillons de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) et la dorade royale (*Sparus.aurata*) prélevés mensuellement de Janvier 2017 à Décembre 2018 est résumée dans les tableaux suivants :

Tableau 2.1 : répartition des échantillons de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) d'élevage et sauvage en fonction des sites de prélèvement.

	Boumerdes	Azeffoune	Tipaza
Poisson d'élevage	340	40	150
Poissons sauvage	80	20	60
Totale	420	60	210

Tableau 2.2 : répartition des échantillons de loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) d'élevage et sauvage collectés mensuellement de janvier 2017 à décembre 2018.

Sites	Année	n. <i>Dicentrarchus labrax</i>												TOT	
		Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Jun	Jul	Aut	Sep	Oct	Nov	Dec		
Boumerdes	F1	2017	7	7	6	7	7	6	7	7	6	7	7	6	80
		2018	7	7	6	7	7	6	7	7	6	7	7	6	80
	F2	2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	2017	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	20
		2018	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	20
Azeffoune	F3	2017	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
		2018	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	8
	S	2017	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	6
		2018	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	4
Tipaza	F4	2017	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	34
		2018	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
	S	2017	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	20
		2018	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	20
TOT		23	32	30	22	32	30	22	32	31	23	32	31	340	

Tableau 2.3 : répartition des échantillons de la dorade royale (*Sparus.aurata*) d'élevage et sauvage collectés mensuellement de janvier 2017 à décembre 2018.

Sites	Année	n. <i>Sparus aurata</i>												TOT
		Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	juin	Jul	Aut	Sep	Oct	Nov	Dec	
Boumerdes	2017	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	48
	F1 2018	4	4	5	4	4	5	4	4	5	4	4	5	52
	2017	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	40
	F2 2018	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	40
	S 2017	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	20
	2018	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	20
Azefoune	2017	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	F3 2018	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	8
	S 2017	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	6
	2018	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	4
Tipaza	2017	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	40
	F4 2018	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	40
	S 2017	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	2018	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	8
TOT		30	28	29	30	28	29	30	29	29	30	29	29	350

2.2.2.3. Méthodes

➤ prélèvements

Les échantillons ont été prélevés aseptiquement dans des sacs (Stomacher) stériles entreposés dans des glacières, puis transportés au laboratoire.

Le numéro d'identification et la date de prélèvement ont été reportés sur chaque sac (Stomacher) et notés sur un registre.

Les prélèvements de produits de la mer ont été conservés au réfrigérateur et analysés dans les 24 heures qui suivent la collecte.

➤ Analyse des poissons

Les prélèvements de la peau, branchies et viscères ont été réalisés de manière aseptique sur chaque individu et découpés en petits morceaux en utilisant une pince stérile et un scalpel. Le mélange obtenu a été divisé en deux parties :

Une détection de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* selon la norme ISO / TS 21872-1 : 2007 [265], et l'autre pour la détection d'autres espèces de *Vibrio* selon la norme ISO / TS 21872-2 : 2007 [266].

- Détection de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*

Pour la recherche de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*, deux enrichissements sélectifs successifs ont été utilisés :

- Le premier consiste à homogénéiser 25 g du produit analysé avec 225 ml d'eau peptonée alcaline à 2% de NaCl (pH 8,6 ± 0,2) avec un (stomacher) pendant 60 s à 230 tr / min et incubé à 41,5 ° C pendant 6 ± 1 heures.

- Le second enrichissement en milieu sélectif liquide consiste à transférer 1 ml prélevé en surface de la culture obtenue lors du premier enrichissement dans un tube contenant 10 ml d'eau peptonée alcaline saline ; puis incubé 18 ± 1 h à 41,5 ° C.

A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement a été fait sur gélose TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose ; Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) ; puis incubé 24 ± 1 heures à 37 °.

Les colonies caractéristiques sont de coloration jaune (lactose +) ou de coloration verte (lactose -) :

Les colonies jaunes et plates de 2 à 3 mm de diamètre présomptives de *Vibrio cholerae*,

Les colonies jaunes de grande taille présomptives de *V. alginolyticus*,

Les colonies jaunes ou translucides présomptives de *V. fluvialis* et de *V. vulnificus*

Les colonies incolores à centre vert présomptives de *V. parahaemolyticus*

Cinq colonies caractéristiques pour chaque espèce présomptive de *Vibrio* isolée sur chacune des boîtes de Pétri ont été repiquées sur la gélose nutritive alcaline (GNA) à 2 % de NaCl (Biomerieux, Marcy l'Etoile, 2016, France), puis incubées 24 h à 37°C pour l'obtention des isolats pures.

➤ Identification bactérienne par l'étude des caractères phénotypiques :

Une identification présomptive est réalisée sur les colonies isolées par la recherche de l'oxydase, de l'arginine dihydrolase (ADH) et de la Lysine décarboxylase (LDC).

L'identification est poursuivie sur les isolats oxydase positive, ADH négative et LDC positive avec l'ensemencement d'une galerie *Enterobacteriaceae* API 20^E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) et d'une galerie de croissance en sel constituée d'une série de tubes d'eau peptonée alcaline contenant 0, 3, 6, 8 et 10 % de NaCl. [267] (tableau 2.4).

Confronter les résultats de l'identification donnés par le décodage de la galerie API 20^E (en tenant compte, pour l'ADH et la LDC, des résultats des cultures en tubes) à ceux donnés par la galerie en concentration croissante en NaCl (0-3-6-8-10%) interprétée selon le tableau suivant :

Tableau 2.4 : Les résultats d'ensemencement des espèces du genre *vibrio* dans des galeries de croissance en sel.

Galerie en sel					Interprétation
0 %	3 %	6 %	8 %	10 %	
+	+	+/-	-	-	<i>Vibrio cholerae</i>
+/-*	+	+	+/-	+/-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
+/-*	+	+/-	-	-	<i>Vibrio vulnificus</i>
+/-*	+	+	+	+/-	<i>Vibrio alginolyticus</i>

* Lorsqu'elle existe, la croissance est faible

❖ La Conservation des isolats de *Vibrio*

Un volume de 1 ml de culture de *Vibrio* dans le milieu TSB à 2 % de NaCl de 6 à 12 heures, et 0,1 ml de glycérol stérile ont été mis dans des cryotubes stériles et conservés dans un congélateur à - 20°C.

• Détection d'autres espèces de *Vibrio*

C'est la même méthode citée si dessus sauf que pour la recherche d'autres espèces de *Vibrio* (autre que *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae*), il est nécessaire de modifier uniquement la température d'incubation des deux enrichissements sélectifs : Le premier enrichissement nécessite une incubation à 37 ° C pendant 6 ± 1 h, tandis que le second nécessite une incubation à 37 ° C pendant 18 ± 1 h.

- Confirmation de l'identification

Les identifications obtenues par les tests biochimiques ont été confirmées par la *technique* de spectrométrie de masse à ionisation douce MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight, 2014*) et par la technique moléculaire PCR, dans le laboratoire de recherche en microbiologie alimentaire de l'Université de MESSINE, Département des sciences vétérinaire, en Italie.

- Identification par Le MALDI-TOF MS :

Pour l'identification par MALDI-TOF MS, des colonies de *Vibrio* revivifiées sur gélose nutritive alcaline (avec 2% de NaCl) ont été directement transférées en utilisant une boucle d'inoculation (1µl loop) sur des plaques cibles FlexiMass MALDI, avec des spots de 48 puits (bioMérieux, Firenze, Italie). Chaque colonie a été étalée sous forme de film mince sur un seul puits, recouverte de 1 µl de la solution matricielle HCCA (solution saturée d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dans 500 ml d'acétonitrile (solvant organique), et 25 ml d'acide tri-fluoroacétique) et séchée à l'air pendant 3-5 minutes à température ambiante.

Escherichia coli ATCC 8739, utilisé comme contrôle d'identification interne, cultivé sur gélose au sang de mouton (Biolife, Italie) pendant 24 heures et inoculé par la suite sur des points de calibrage spécifiques et séparés (position G3 et G4). Après cristallisation de la matrice et du matériel microbien, les plaques ont été introduites dans un spectromètre de masse Vitek MS Axima Assurance (bioMérieux, Florence, Italie) en mode linéaire positif à une fréquence laser de 50 Hz avec une tension d'accélération de 20 kV et un temps de retard d'extraction de 200 ns. Spectres de masse détectés allant de 2 000 à 20 000 Da.

MALDI-TOF génère des spectres de masse unique pour les micro-organismes qui ont été transférés dans le logiciel SARAMIS (Spectral ARchive And Microbial Identification System - Database version V4.12 - Software year 2013, bioMérieux, Firenze, Italy) où ils ont été comparés à la base de données contenant les spectres de référence des bactéries. La base de données SARAMIS contient plus de 25 000 spectres de 586 espèces bactériennes et fongiques [268]. Un pourcentage de probabilité, ou niveau de confiance, a été calculé par l'algorithme du logiciel. Cette valeur représente la similarité en termes de présence ou d'absence de pics spécifiques entre le spectre généré et

les spectres de la base de données. Une correspondance parfaite entre le spectre de l'échantillon et le spectre unique d'un seul organisme ou groupe de bactéries a permis d'obtenir un niveau de confiance de 99,9% ("excellente ID").

Pour un niveau de confiance allant de > 60 % à 99,8 %, l'identification a été considérée comme "bonne ID" parce que le spectre était suffisamment proche de celui d'un spectre de référence ; tandis que pour la valeur < 60 %, "aucune identification" (no ID) a été donnée [269].

➤ Test sérologique

Toutes les isolats de *V. cholerae* identifiées ont été testées pour la recherche des serogroupes O1/ O139 en utilisant des sérums agglutinants pour l'O1 (BTA 491, Microgen Bioproducts, Camberley, UK) et l'O139 (BTA 494, Microgen Bioproducts, Camberley, UK). Les isolats identifiées comme O1 ont été testées par la suite pour l'appartenance au serotype Ogawa (BTA 493, Microgen Bioproducts, Camberley, UK) et Inaba (BTA 492, Microgen Bioproducts, Camberley, UK) avec des sérums agglutinants spécifiques.

➤ Identification moléculaires

• Extraction de l'ADN bactérien

Les isolats de *Vibrio* conservées ont été cultivées sur gélose nutritive alcaline (à 2% de NaCl) incubées à 37°C pendant 18±1 heures (selon la norme UNI EN ISO 21872-1:2017) [270]. Une anse pleine de colonies a été prélevée et triturée dans 500 µl de solution saline stérile (0,85% NaCl) préalablement distribuée dans les microtubes de 1,5 ml. L'extraction de l'ADN a été réalisée par un traitement thermique dans un thermomixeur (Eppendorf, Hambourg, Allemagne, 2014) réglé à 95°C pendant 5 minutes. Après ce traitement, les tubes ont été centrifugés à 10000 tours/minute pendant 1 minute, et le surnageant contenant l'ADN bactérien a été pipeté dans des eppendorf et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

• Confirmation de l'identification des espèces de *Vibrio* par PCR

Tous les isolats biochimiques identifiés ont été confirmées aux genres *vibrio* par l'amplification du gène *rpoA* qui codifie pour la sous-unité alpha de l'ARN polymérase [271].

Le mélange réactionnel de chaque PCR était préparé comme suit : 0,5 µg d'ADN génomique purifié, 25 pmol de chaque amorce, tampon d'amplification 1X, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chacun des dNTP (Invitrogen, Paisley, UK) et 1 U de Taq DNA polymérase (Invitrogen, Paisley, UK), pour un mélange final de 50 µL et un contrôle du mix PCR est réalisé en ajoutant 1 µL d'eau distillée stérile (H₂O) au mix PCR. La confirmation de la présence de *Vibrio cholerae* a été effectuée conformément à la norme UNI EN ISO 21872-1:2017 [270] par la détection de la région cible prVC [272] et par la recherche du gène de virulence *ctxA* pour les isolats de *vibrio cholerae* O1/O139. [273]

L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur (C1000 Touch, Bio-Rad, Italie) : dénaturation à 94°C pendant 1 min, suivi d'une hybridation à 63°C pendant 1,5 min, et une élongation à 72°C pendant 1,5 min), durant 30 cycles.

Une réaction d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (100ml de tampon Tris-borate-EDTA avec 2g d'agarose, Sigma-Aldric, Italie) a été réalisée avec 5 µL de produit d'amplification pendant 40 min à 90 V. Après migration en tampon Tris-borate-EDTA (TBE), les produits d'amplification sont mis en évidence après coloration par le Bromure d'Éthidium (BET), agent qui s'intercale entre les bases de l'ADN et qui est fluorescent en lumière ultra-violette (UV) (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA, 2007) et analysés avec le logiciel Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Leur taille est déterminée par rapport à l'ADN témoin et avec les bandes d'un marqueur de poids moléculaire de 100 pb d'ADN (Invitrogen Ltd, Paisley, Royaume-Uni, 2018) ayant migré dans les mêmes conditions. Des contrôles internes sont également réalisés dont un témoin négatif (un mélange PCR sans ADN) et deux témoins positifs (les isolats de référence *V. alginolyticus* ATCC 17749 (pour *rpoA*) et *V cholerae* CCUG 3751 (pour *prVC*)). Toutes les amorces ont été synthétisées par Operon Technology (Cologne, Allemagne, 2018). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification sont énumérées dans le tableau 2.5 [271], [272], [273].

Tableau 2.5 : Séquences des amorces utilisées dans notre étude pour la détection des vibrions.

Genès cibles	Amorces	Poids moléculaires	Séquences	Références
<i>rpoA</i>	<i>rpoAf</i>	242 pb	AAATCAGGCTCGGGCCT	[271]
	<i>rpoAf</i>		GCAATTTT(A/G)TC(A/G/T)AC(C/T)GG	
<i>prVC</i>	<i>prVCf</i>	300	TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG	[272]
	<i>prVCf</i>		AGTCACTTAACCATAACAACCCG	
<i>ctxA</i>	<i>CTX2</i>	505	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	[273]
	<i>CTX3</i>		CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	

2.2.3. RESULTATS

Les résultats de cette étude ont révélé que nous avons pu isoler 42 isolats de *Vibrio* spp à partir de la flore du loup de mer et la dorade royale.

- Résultats d'identification préliminaire par la galerie API 20^E

- *V. alginolyticus* :

La bactérie est de couleur jaune sur TCBS (saccharose +), oxydase+, mobile à l'état frais, présente un développement dans l'eau peptonée alcaline à 3%, 6% et 8% de NaCl mais plus au moins à 0%.

- *V. hollisae*

Elle est oxydase+, mobile à l'état frais, et de couleur jaune sur TCBS alors que *vibrio hollisae* se développe mal sur le milieu TCBS[118] .

- *V. cholerae*

Après 24 heures d'incubation, des colonies typiques jaunes brillants (2-3 mm) sont apparues sur TCBS, elles ont été initialement considérés comme *V. cholerae* ; Elle était oxydase +, en forme de virgule, mobile à l'état frais et tolère jusqu'à 3% de NaCl.

V. fluvialis

Elle est oxydase+, mobile à l'état frais, de couleur jaune sur TCBS et présente un développement dans l'eau peptonée alcaline à 3% et 6% de NaCl mais plus au moins à 0%.

Les résultats de la galerie API 20^E des vibrions isolés sont résumés dans tableau suivant (tableau 2.6) :

Tableau 2.6 : Les caractères biochimiques des vibrions sur les galeries API 20^E

Caractères biochimiques	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio hollisae</i>	<i>Vibrio Fluvialis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
ONPG	-	-	+	+
ADH	-	-	+	-
LDC	+	-	-	+
ODC	+	-	-	+
CIT	-	-	-	+
H ₂ S	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	-	+	-	-
INDOLE	+	+	+	+
VP	-	-	-	+
Gélatine	+	-	+	+
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-
Saccharose	+	-	+	+
MEL	-	-	-	-

Dans cette étude, 15 isolats de *V. cholerae* ont été isolés, 5 isolats de *V. fluvialis*, 20 isolats de *V. alginolyticus* et 2 isolats de *V. hollisae*.

V. alginolyticus était l'espèce la plus dominante 48 %, suivi de *V. cholerae* 36 %, *V. fluvialis* 12% et *vibrio hollisae* 4 %. (Figure 2.5)

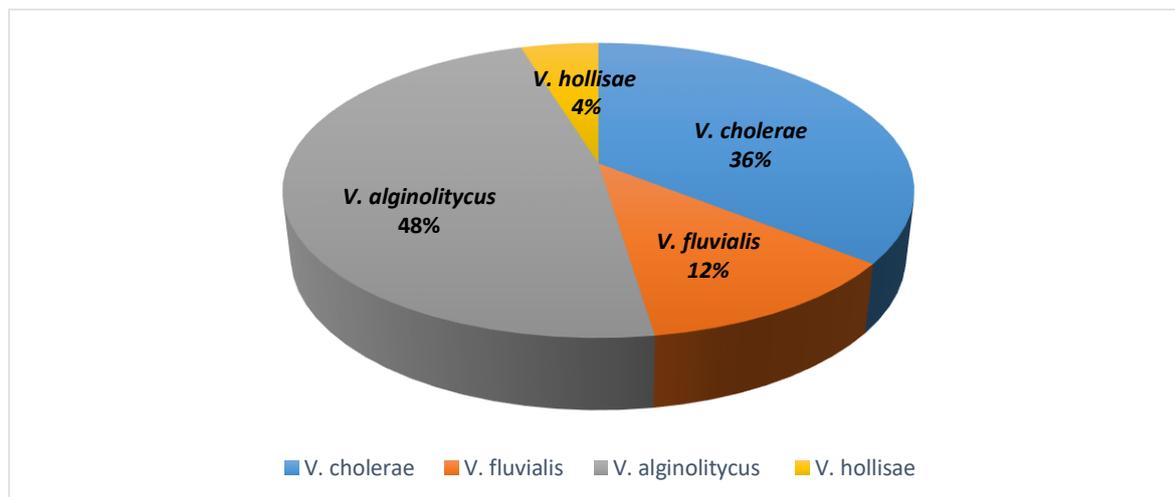


Figure 2.5 : Le pourcentage d'isolement des vibrions dans l'ensemble des poissons analysés.

D'après les résultats serologiques les isolats de *vibrio cholerae* isolés sont non-O1 et non-O139 (non agglutinant aux antisérums O1 et O139).

- Résultats de confirmation par MALDI-TOF/SM et PCR :

Les 42 isolats (identifiées biochimiquement) ont été confirmées comme appartenant au genre *vibrio* par PCR (*rpoA*) et analyse MALDI-TOF/SM (Figure 2.6).

les 15 isolats de *V. cholerae* ont été confirmées par MALDI-TOF comme étant *vibrio cholerae* avec un niveau de confiance > 90%, tandis que les 20 isolats de *V. alginolitycus* ont été confirmées par MALDI-TOF avec un niveau de confiance > 95%, Les 17 isolats biochimiquement identifiées comme étant *V. fluvialis* ont été toutes confirmées par l'analyse MALDI-TOF/SARAMIS avec un niveau de confiance > 97% et les 2 isolats de *V. hollisae* ont été confirmées avec un niveau de confiance > 85%.

La détection du gène *rpoA* par PCR a confirmé la présence des 42 isolats du genre *vibrio*.

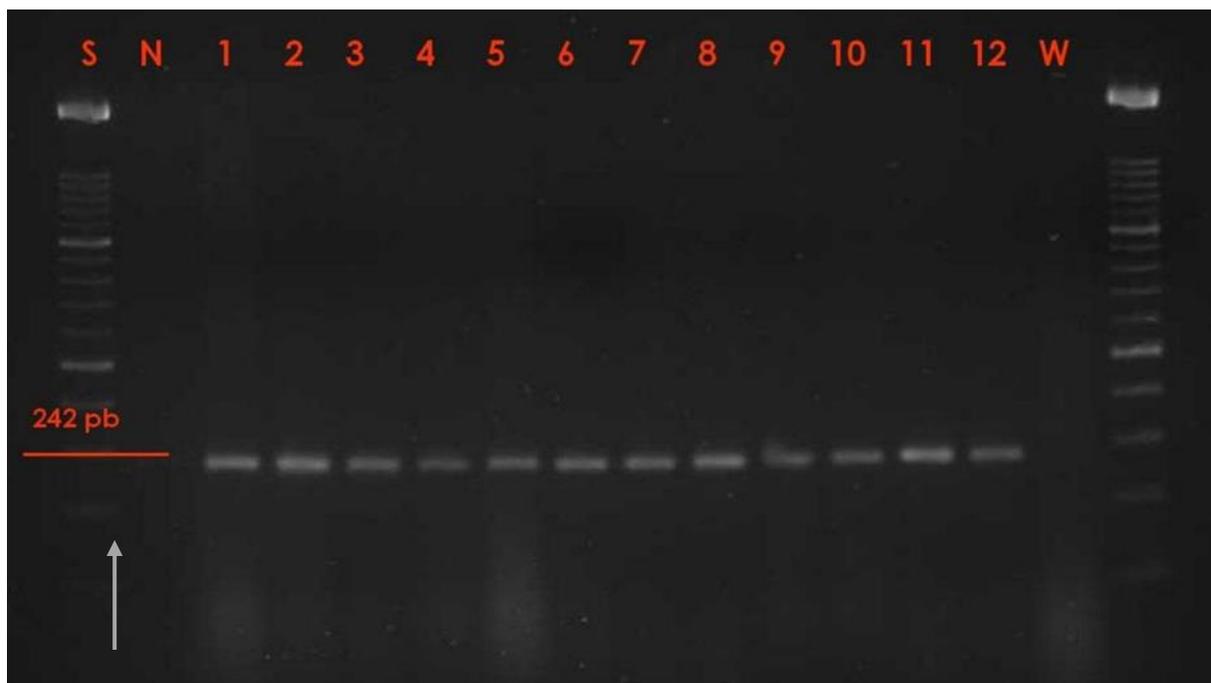


Figure 2.6 : Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *rpoA* (242 pb) des isolats de *vibrio* isolées.

Colonne S : Marqueur de taille moléculaire de 100 pb ; Colonne N : contrôle négatif ; colonne 1 : contrôle positif (*V. alginolyticus* ATCC 17749) ; colonne 2-12 : échantillons positifs ; colonne W : contrôle de l'eau.

- La prévalence des vibrions en fonction des produits de mer analysés (tableau 2.7 et fig.2.7) :

Tableau 2.7 : Les résultats de prévalence des vibrions chez le loup de mer et la dorade royale :

Espèces isolées	<i>sparus aurata</i>		<i>dicentrarchus labrax</i>		Total	
	Nombre de souche	Prévalence	Nombre de souche	Prévalence	Nombre isolats total	Prévalence Total
<i>v,alginolyticus</i>	13	3,71 %	7	2,06%	20	2,90 %
<i>v,cholerae</i>	10	2,86 %	5	1,47 %	15	2,17 %
<i>v,fluvialis</i>	2	0,57 %	3	0,88 %	5	0,72 %
<i>v,hollisae</i>	0	0 %	2	0,59 %	2	0,29 %
						6,08 %

Cette étude a montré une prévalence globale du genre *Vibrio* de 6,08 % (tableau 2.7 et figure 2.7) dans l'ensemble des produits de la mer analysés. Cette prévalence est répartie comme suit :

- *V.alginolyticus* 2,90 % dont 3,7 % chez la dorade et 2,06 % chez le loup de mer.

- *V.cholerae* a une prévalence de 2,17 % dont 2,86 % chez la dorade et 1,47 % chez le loup de mer.

- *V. fluvialis* avec une prévalence de 0,72 % dont 0,57% chez la dorade et 0,88 % chez le loup de mer.

V. hollisae avec une prévalence de 0,29 % dont 0,59% chez le loup de mer et aucun vibron n'a été isolé chez la dorade royale.

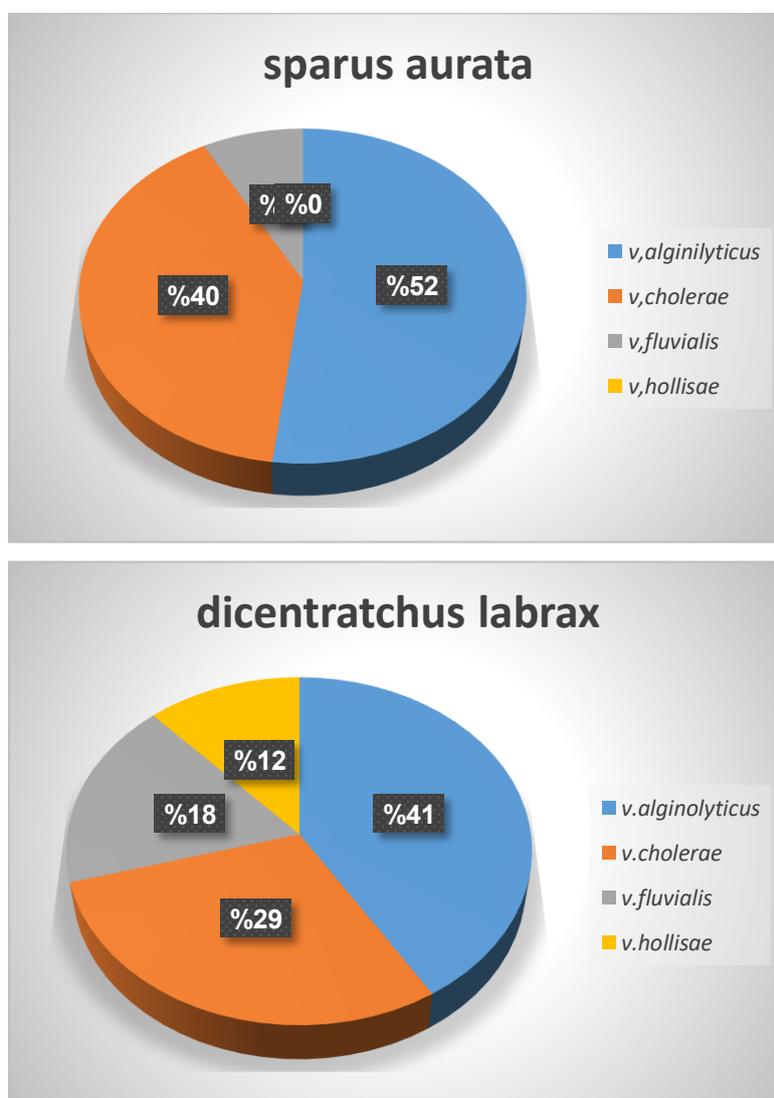


Figure 2.7 : Résultats d'isolement des vibrions chez le loup de mer et la dorade royale

Toutes les espèces bactériennes du genre *vibrio* qui ont été isolées à partir de la flore de *Sparus aurata*, étaient également présents dans la flore de *dicentrachus labrax* (à savoir *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio fluvialis*), sauf *vibrio hollisae*, elle était présente que dans la flore de *dicentrachus labrax*.

- La prévalence des vibrions en fonction des sites de prélèvement (figure.2.8).

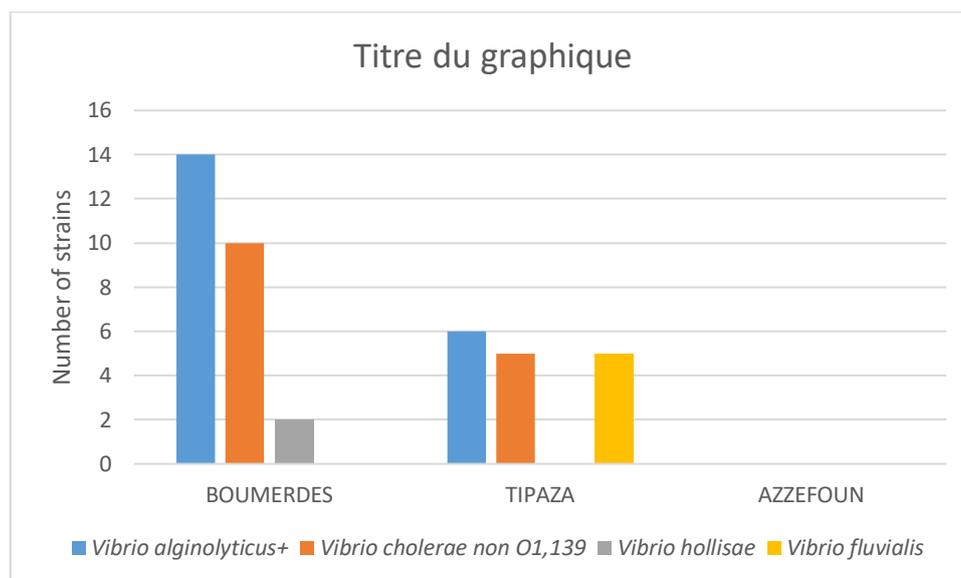


Figure 2.8 : Répartition des *Vibrio* en fonction des sites de prélèvement

Le taux de contamination des vibrions dans notre étude est variable d'un site à l'autre :

Pour la région de Boumerdes, 26 isolats de vibrions ont été isolées, soit 6,19% d'incidence dont 17 isolats dans la ferme F1 de l'ONDPA (9 isolats de *Vibrio alginolyticus*, 6 isolats de *Vibrio cholerae* et 2 isolats de *Vibrio hollisae*), et 9 isolats dans la ferme de Zemmouri F2 (5 isolats de *Vibrio alginolyticus* et 4 isolats de *Vibrio cholerae*), alors qu'aucune souche de vibrio n'a été détectée chez les poissons sauvages.

Dans la région de Tipaza, seize isolats de vibrio ont été isolées de la ferme E.A.M (F4), soit 7,62 % d'incidence, à savoir 6 isolats de *Vibrio alginolyticus*, 5 isolats de *Vibrio cholerae* et 5 isolats de *Vibrio fluvialis*, mais aucune souche n'a été détectée chez les poissons sauvages.

Dans la région d'Azzefoun, nous n'avons pas pu isoler des vibrions, ni chez les poissons d'élevage (F3) ni chez les poissons sauvages.

- La prévalence des vibrions en fonction de la saison de prélèvement est résumée dans le tableau 2.8 et les figures 2.9) :

Tableau 2.8 : Résultats de répartition des isolats de Vibrions isolées en fonction de la saison de prélèvement :

espèces	Saison	<i>sparus aurata</i>				<i>dicentrarchus labrax</i>				TOT
		F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	
<i>v.alginilyticus</i>	Hiver	1	0	0	0	1	0	0	0	2
	Printemps	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Été	3	4	0	2	2	0	0	2	13
	automne	1	1	0	1	1	0	0	1	5
<i>v.cholerae</i>	Hiver	1	0	0	0	1	0	0	0	2
	printemps	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Été	2	4	0	1	2	0	0	1	10
	automne	0	0	0	2	0	0	0	1	3
<i>v.fluvialis</i>	Hiver	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	printemps	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Été	0	0	0	1	0	0	0	2	3
	automne	0	0	0	1	0	0	0	1	2
<i>v.hollisae</i>	Hiver	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	printemps	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Été	0	0	0	0	2	0	0	0	2
	automne	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOT		8	9	0	8	9	0	0	8	42

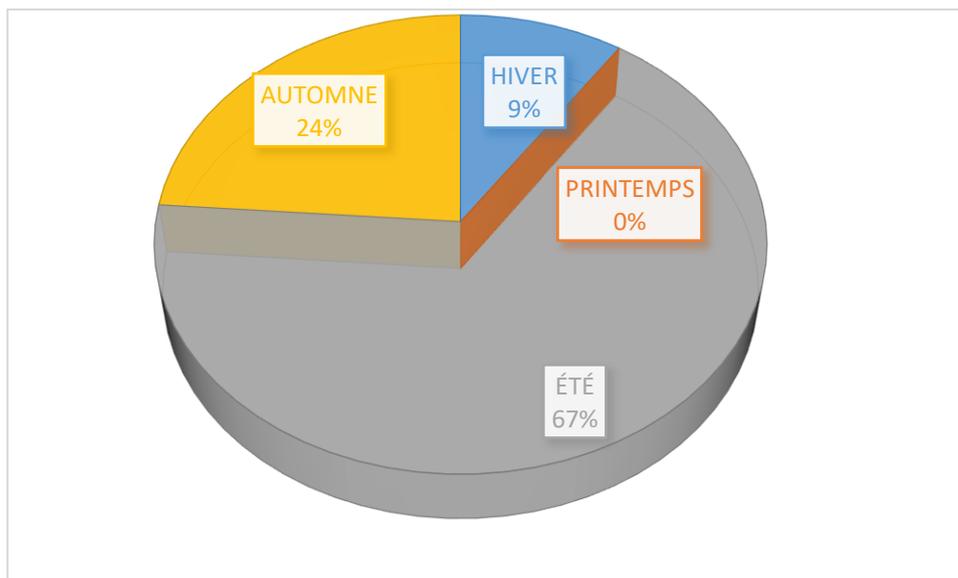


Figure 2.9: Répartition des *Vibrio* en fonction de la saison de d'échantillonnage.

Les résultats obtenus de la présente étude montrent que l'isolement des vibrions est en relation avec la saison d'échantillonnage, 67% des *vibrio* ont été isolés en été et surtout en mois d'août et 24% en automne et 9% en hiver, par contre aucun *vibrio* n'a été détecté au printemps.

➤ Résultats de l'étude statistiques :

Pour comparer les données de cette étude, entre les espèces de *vibrio* isolées et la saison d'échantillonnage, le site de prélèvement et l'espèce de poisson analysée, des tests d'analyse de variance à un facteur ont été réalisés (test ANOVA et le test de Student), à l'aide du logiciel BIOSTATGV – version v13.

Les résultats ont été jugés significatifs à $P < 0,05$.

- La corrélation entre les espèces de *vibrio* isolées et la saison d'échantillonnage :

Les différences significatives entre les espèces de *vibrio* isolées et la saison d'échantillonnage ont été testées par le test de variance à un facteur ANOVA (tableau 2.9).

Tableau 2.9 : résultats du test d'ANOVA entre les espèces de *vibrio* isolées et la saison d'échantillonnage

Les espèces	Hiver	printemps	été	Automne
<i>v.alginilyticus</i>	2	0	13	5
<i>v.cholerae</i>	2	0	10	3
<i>v.fluvialis</i>	0	0	3	2
<i>v.hollisae</i>	0	0	2	0
Résultat ANOVA	P : 0.025300345164821			

P < 0,05.

Les résultats obtenus par le test ANOVA montrent qu'il y a une corrélation entre les espèces de *vibrio* isolées dans cette étude et la saison d'échantillonnage ($p < 0.05$).

- Corrélation entre les espèces de *vibrio* isolées et le site de prélèvement :
Les différences significatives entre les espèces de *vibrio* isolées et le site de prélèvement ont été testées par le test ANOVA (tableau 2.10).

Tableau 2.10 : résultats du test d'ANOVA entre les espèces de *vibrio* isolées et les sites de prélèvement :

Les espèces	La zone de Boumerdes	La zone d'Azzefoun	La zone de Tipaza
<i>v.alginilyticus</i>	14	0	6
<i>v.cholerae</i>	10	0	5
<i>v.fluvialis</i>	0	0	5
<i>v.hollisae</i>	2	0	0
Résultat ANOVA	P : 0.13437574479893		

p > 0,05.

Les résultats du test statistique ANOVA indiquent qu'il n'existe pas de différence significative entre les espèces de *vibrio* isolées et les sites de prélèvements des poissons ($p > 0,05$).

- Corrélation entre les espèces de *vibrio* isolées et l'espèce de poisson analysée :

Les différences significatives entre les espèces de *vibrio* isolées et l'espèce de poisson analysée ont été testées par le test de Student (tableau 2.11).

Tableau 2.11 : résultats du test de student entre les espèces de *vibrio* isolées et l'espèce de poisson analysée

Les espèces	<i>sparus aurata</i>	<i>dicentrarchus labrax</i>
<i>v.alginilyticus</i>	13	7
<i>v.cholerae</i>	10	5
<i>v.fluvialis</i>	2	3
<i>v.hollisae</i>	0	2
Résultat test Student	P : 0.58040053454523	

p> 0,05.

Les résultats du test de Student montrent qu'il n'existe pas de différence significative entre les espèces de *vibrio* isolées et l'espèce de poisson analysée (p> 0,05).

2.2.4. DISCUSSION

La flore microbienne du poisson impacte la santé des consommateurs car elle renferme des bactéries pathogènes telles que : *Salmonella spp*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *staphylocoque aureus*, *L. monocytogenes* et *Aeromonas hydrophila* [274] et principalement des bactéries du genre *Vibrio* [3, 21].

Il est rare que des agents pathogènes pénètrent dans la chair comestible des poissons (muscles). Cependant, si les poissons sont stressés (par exemple en raison du surpeuplement, de la mauvaise qualité de l'eau ou d'autres conditions) ou à la mort ou après capture et lorsque le poisson est exposé à une température supérieure à 8°C, ces germes peuvent s'introduire dans la chair comestible [275], [276].

Cette étude a montré une prévalence globale du genre *Vibrio* de 6.04 % dans l'ensemble des poissons analysés ; Cependant, les résultats de El-Hady et al. [277] ont montré que cinq espèces du genre *vibrio* ont été isolés chez différents poissons d'élevage, avec une prévalence globale de 27,5 % ; sur un total de 353 échantillons de poissons collectés entre 2015 et 2016 en Arabie saoudite, les vibrions ont été isolés à une prévalence globale de 54,95% [278]. Une autre étude menée en Nigeria par

Adebayo-Tayo et al. [279], montre que les vibrions ont été isolés avec une prévalence de 90% à partir de la flore branchiale de 120 échantillons de poissons.

Dans notre étude quatre espèces de vibrions ont été isolés, à savoir, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* et *V. hollisae*. *Vibrio alginolyticus* était la plus prédominante (n : 20), selon les résultats de Moustafa et al. [280], *Vibrio alginolyticus* était l'espèce pathogène la plus fréquemment isolée chez la daurade royale d'élevage ; selon une étude menée en Tunisie, *Vibrio alginolyticus* était le germe le plus prédominant de la microflore de 113 échantillons de poissons [281].

La prévalence d'isolement de *V. alginolyticus* à partir de loup de mer et la dorade royale était de 2,90%, cependant, en Egypte, *Vibrio alginolyticus* a été isolé avec une prévalence de 87.28% dans un élevage de loup de mer et daurade royale [282], Ravikuma et al. l'ont isolé avec une prévalence de 17% en Inde. Cependant, selon une étude menée par Dib [262], en Algérie, *Vibrio alginolyticus* a été isolée dans un seul échantillon de sardine et *Vibrio alginolyticus* a été isolé avec une prévalence faible de 6,43 % dans un élevage de la dorade royale en Arabie saoudite [284]. Les travaux d'Okonko et al. [285] et Adebayo-Tayo et al [279], ont montré que *Vibrio alginolyticus* a été isolé avec une prévalence de (3,8 %) à partir de différents prélèvements de poissons.

La présence de *Vibrio alginolyticus* dans le loup de mer et la daurade royale qui sont destinés à la commercialisation (donc à la consommation), présente un danger pour la santé humaine car les infections à *Vibrio alginolyticus* principalement rapportées sont des otites, des conjonctivites, des pyodermites superficielles et des gastro-entérites. Chez les sujets immunodéprimés, elles peuvent devenir graves et potentiellement mortelles. Elle 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'infection cutanée, en particulier chez les malades ayant été en contact avec de l'eau de mer de régions chaudes ou des animaux marins [286].

Selon Zorrilla et al. [287] et Ben Kahla-Nakbi et al. [288], *Vibrio alginolyticus* est considérée comme le principal pathogène bactérien décrit dans l'élevage du loup et de la daurade dans la région méditerranéenne. A cet effet, l'isolement de cette bactérie à partir de la flore branchiale et intestinale du loup de mer et la dorade royale d'élevage dans notre étude pourra engendrer des mortalités importantes et des pertes

économiques énormes. Certains facteurs peuvent favoriser l'expression de sa virulence, comme les manipulations de pêche, la densité et le tri des poissons élevés dans les bassins, ainsi que les conditions physico-chimiques de température, salinité et oxygène dissous.

Les infections à *Vibrio non cholerae* se sont développées ces dernières années et les risques sanitaires liés aux vibrions sont susceptibles d'être exacerbés dans les années à venir par le changement climatique, l'augmentation de la consommation des produits de la mer et le nombre de personnes immunodéprimées [289].

Dans notre étude, *Vibrio cholerae non O1/ non O139* a été isolé avec une prévalence de 2,17 %, alors qu'elle était la bactérie la plus dominante (47,2 %) dans les branchies de 120 échantillons de poisson prélevés au Nigeria [279]. Chez les larves de *dicentrachus labrax*, d'une éclosure en Turquie et dans les branchies et l'intestin de carpe et poisson-chat, il était aussi isolé de la flore intestinale de dix espèces de poissons d'eau douce (71 %) et une espèce marine (2,3 %).

A Qingdao en Chine, il a été détecté dans le tractus gastro-intestinal du turbot adulte d'élevage (*Scophthalmus maximus*) [290]. En Inde, *V. cholerae* a été isolé à partir de deux espèces de poissons (*Priacanthus hamrur* et *Megalaspis cordyla*) capturés au large des côtes de Royapuram [291]. Lors de l'évaluation de la qualité microbiologique du requin siamois (*Pangasius hypophthalmus*) transformé pour l'exportation au Vietnam, il a été isolé à partir de son filet et l'eau utilisée pour les rincer [292]. Par contre, aucune souche de *V. cholerae* (*V. cholerae non O1/non O139*) n'a été isolée à partir de 37 échantillons de produits de pêches au Maroc [293].

V. cholerae (sérogroupes non-O1/non-O-139) est l'espèce responsable de la plus grande diversité de syndromes, elle est responsable d'infections cutanées et d'infections par voie digestive, lors de toxi-infections alimentaires isolées ou collectives. En effet, chez des sujets immunodéprimés, elle peut provoquer des septicémies dans 5 % des cas, avec un taux de mortalité de 1 à 4 %, principalement chez les patients développant une septicémie. Les facteurs de risque sont principalement l'exposition au milieu marin ou la consommation de produits de la mer crus ou mal cuits [294].

Peu de données sont disponibles au niveau mondial sur les infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139. Selon certains rapports du CDC (Center for Disease Control and Prevention) [295], 10 % des infections à *Vibrio* d'origine alimentaire observées aux États-Unis étaient dues à *V. cholerae* nonO1/non-O139. Ces souches étant également responsables de près de 5 % des infections par voie cutanée [296]. En Europe, une étude récente menée en Italie a montré que 3,4 % des cas hospitalisés pour gastroentérites aiguës après consommation de produits de la mer étaient dus à *V. cholerae* non-O1/non-O139 [297].

V. fluvialis est considéré comme un pathogène alimentaire émergent et a été impliqué dans des épidémies et des cas sporadiques de diarrhée aiguë [298], [299]. En outre, *V. fluvialis* représente une menace économique importante pour l'aquaculture car il est pathogène pour les poissons d'élevage et les homards [300]. La gastro-entérite causée par cet organisme est associée à la consommation d'eau contaminée ou de fruits de mer crus ou mal cuits [301], [302]. De plus, des infections extra-intestinales associées à *V. fluvialis*, telles que des cellulites et des cérébrites hémorragiques [303], des péritonites [304], des otites aiguës [305], des infections des voies biliaires [306], des bactériémies [307] et même des infections oculaires [308] ont également été signalées.

Cinq souches de *Vibrio fluvialis* ont été isolées dans notre étude, avec une prévalence de 0.72%. Elle est relativement inférieure à celle rapportés par Adebayo-Tayo et al. [279], qui ont pu isolé 7 souches de *Vibrio fluvialis* chez 120 échantillons de poissons de mer avec une prévalence de 13,2% et à celle de Hadi et al [309] qui l'ont isolé avec une prévalence de 7,6% . En Turquie, après *V. alginolyticus* (>30 %), *V. fluvialis* était le *vibrio* le plus prédominant dans les crabes bleus et les poissons vendus au détail (>10 %) [310], [311]. La plus grande épidémie d'infection à *V. fluvialis* a été signalée au Bangladesh entre octobre 1976 et novembre 1977, avec plus de 500 patients [312]. Aux États-Unis, *V. fluvialis* représentait 10 % des cas cliniques causés par les vibrions le long de la côte du Golfe du Mexique [313]. Les données de surveillance du vibron montrent qu'il était responsable de 82 cas parmi les 1 584 infections à *Vibrio* signalées aux Centers for Disease Control and Prevention entre 1997 et 2000 [314]. Srinivasan et al., ont rapporté que *V. fluvialis* est isolé avec une fréquence accrue chez les patients

hospitalisés à Kolkata, en Inde, atteints de maladies similaires au choléra [315]. Une étude du groupe de Ramamurthy a révélé que le taux d'isolement de *V. fluvialis* est passé de 0,7 % en 2002 à 2,2 % en 2009 [316]. Récemment, il a été rapporté que 3 529 (91,2 %) des 3 871 résidents du village, en Inde orientale, ont été touchés par une diarrhée aqueuse causée par *V. fluvialis* [302]. En outre, *V. fluvialis* s'est comporté de manière plus agressive que *V. cholerae* O1 dans une situation épidémique avec un taux d'attaque plus élevé et un tableau clinique différent [302]. En général, les symptômes cliniques de la gastro-entérite causée par *V. fluvialis* sont similaires à ceux du *V. cholera*, à savoir une déshydratation légère à modérée, des douleurs abdominales, des vomissements, de la fièvre et de la diarrhée avec présence de sang [302], [317]. Par conséquent, *V. fluvialis* est devenu un risque élevé pour la santé publique dans le monde entier, en particulier dans les zones côtières des pays en développement et dans les régions où les conditions sanitaires sont mauvaises.

Vibrio hollisae (*Grimontia hollisae*) a été décrit pour la première fois par Hickman et al. il a été isolé à partir d'un patient présentant une diarrhée aiguë et nommé à l'époque comme une nouvelle espèce, *Vibrio hollisae* [318]. En 2003, il a été reclassé dans le genre *Grimontia* par Thompson et al. [319]. Il est principalement connu pour causer des cas modérés à sévères de gastro-entérite chez les personnes saines. Il est considéré aussi comme pathogène des poissons à faible risque. Cependant, peu d'informations indiquant le rôle de *G. hollisae* dans la pathologie des poissons [320].

Dans notre travail, nous avons isolé *Vibrio hollisae* avec une prévalence de 0,29 %, mais seulement chez le loup de mer d'élevage. Cela pourrait être expliqué par le fait que ce germe était déjà présent au niveau de la flore des poissons avant son importation (les larves importés étaient déjà contaminés par ce germe au niveau de la pisciculture ou ils étaient).

Cette espèce est rarement isolée dans le monde, cela pourrait être dû à la faible croissance de cette bactérie sur les milieux sélectifs des vibrions (TCBS ou gélose Mac Conkey) [321]. Dans cette étude un résultat inhabituel était que cette souche de *V. hollisae* a pu croître sur TCBS, cela pourrait être expliqué par le fait qu'elle coexiste avec d'autre souche de *vibrio*, En outre, les conditions de culture optimales pour l'isolement et l'identification de cette souche peuvent ne pas être la même pour les souches isolées déjà par d'autre auteur.

Selon un suivi qualitatif dans le golfe de Ste Marie de la Mer, le golfe de Fos, la rade de Toulon et la Côte d'Azur (période indéterminée, sur 690 échantillons testés, les vibrions suivants ont été identifiés : *V. parahaemolyticus* (31), *V. metschnikovii* (6), *V. hollisae* (1) et *V. damsela* (1) [322].

Selon une étude faite sur un total de 370 poissons vivants malades (présentant certains signes et symptômes similaires à ceux de la vibriose), dont le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), le tilapia marin (*Oreochromis spilurus*), le mullet (*Mugil cephalus*), loup de mer (*Dicentrarchus labrax*), poisson lapin (*Siganus rivulatus*) et le poisson-chat (*Carus gariépinus*). Ces poissons ont été recueillis auprès de 17 fermes piscicoles situés dans différentes régions de l'Arabie saoudite. L'analyse bactériologique de ces derniers a révélé la présence de *Grimontia (Vibrio) hollisae* à une fréquence de 54,5% [322]. En outre, ce *vibrio* a été isolé aussi chez la sériole (*Seriola dumerili*) malade de vibriose, (c'est à dire la septicémie hémorragique) [323]. Il a été aussi isolé dans des produits de la mer en provenance des États-Unis [321], d'Europe [321], de la mer Méditerranée [324], et de la Turquie [325].

Ce micro-organisme produit des toxines et a été décrit comme un agent de gastro-entérite chez les humains, associée ou non à une bactériémie. Moins de 40 cas de gastro-entérite causée par *G. hollisae* ont été décrits dans la littérature. La majorité des cas ont été signalés aux États-Unis, la plupart du temps sur les côtes de l'atlantique [326] et le golfe du Mexique [327], et moins fréquemment sur les côtes du Pacifique [328] et à Hawaï [329]. Des cas sporadiques ont également été observés en Indonésie [330] et en France [324]. Parmi ceux-ci, six cas ont été compliqués par une bactériémie [326], [324], [331], et un cas par une hypotension et une insuffisance rénale aiguë [321].

La consommation des produits de la mer cru ou mal cuit apparaît comme la source la plus probable de l'infection. Cependant, le faible nombre de cas signalés pourrait s'expliquer par l'absence de croissance de *G. hollisae* sur les milieux utilisés pour l'analyse de routine des selles, comme thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (TCBS) agar.

Les variations saisonnières des paramètres hydro climatiques ont influé significativement sur l'isolement des vibrions dans notre étude. En outre, la plus grande fréquence d'isolement des vibrions était en été. En effet, La densité des vibrions dans

l'environnement marin évolue en fonction de divers facteurs climatiques et environnementaux, tels que la température de surface de l'eau, la salinité, la turbidité, le pH, la chlorophylle A. Le rôle majeur de la température de surface de l'eau sur la présence des *Vibrios* dans différents compartiments marins a été clairement établi, expliquant leur distribution saisonnière, avec une abondance maximale pendant les mois les plus chauds de l'année. Dans l'eau de mer, les variations d'abondance des *Vibrios* totaux (*Vibrio* spp.) sont également expliquées par la salinité et la concentration en matières organiques, alors que dans les sédiments, la température de surface de l'eau est le seul facteur identifié à ce jour affectant de manière significative leur abondance [332].

Par contre, *Vibrio alginolyticus* a été isolé chez la dorade (*Sparus aurata*) et le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) malade cultivées dans deux exploitations piscicoles situées sur la côte méditerranéenne tunisienne, de 2003 à 2005, avec une plus forte concentration au cours des saisons froide (hiver, printemps) [333].

Selon de nombreuses études, l'isolement de formes cultivables des vibrions paraît difficile pendant la saison hivernale, attribué aux conditions défavorables du milieu notamment la baisse de la température et de la salinité (la diminution de la salinité, suite aux fortes pluies) [334], [335], [322]. Dans notre étude on a pu isoler 4 souches de *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio cholerae* pendant la saison hivernale chez les deux espèces de poisson prélevées seulement à partir de la ferme de Cap Djinet. Cette situation a été associée à la mise en place de cette ferme aquacole au niveau du canal de rejet, bénéficiant des eaux chaudes rejetées par la centrale pour favoriser la croissance des poissons, mais elle a favorisé aussi la croissance des vibrions en hiver. Nos résultats sont en accord avec les résultats d'un suivi qualitatif des eaux littorales françaises Sur une période 1989 – 1999 : *V. alginolyticus* et *Vibrio cholerae* ont été régulièrement observés dans l'eau de mer en hiver et en été suite aux rejets des eaux de refroidissement de la centrale nucléaire de Gravelines dans le littoral français [322]. Diverses analyses récentes soulignent l'impact des changements climatiques sur les pathologies infectieuses dans la population humaine et sur les dysfonctionnements des écosystèmes littoraux [336]. Ce phénomène ne semble qu'amorcer et pourrait avoir des répercussions fortes dans un avenir proche, notamment dans des secteurs déjà soumis à des réchauffements spécifiques des eaux littorales (rejets d'eau chaude par les centrales thermiques) [336].

Pendant les mois froids, la prévalence d'isolement des vibrions était faible, cela pourrait être expliqué soit par leur capacité à entrer dans un état dit « viable mais non cultivable », où elles ne peuvent plus se multiplier et donc être détectées sur milieu de culture, mais conservent cependant certaines activités métaboliques. Le retour à des conditions plus favorables permet la réactivation du métabolisme bactérien et une réversion vers des formes normales, capables d'exprimer à nouveau leur pouvoir pathogène, ou bien par l'adhésion de ces espèces à la surface de certains organismes (zooplanctoniques ou sédiments), ou elles pourraient y survivre durant l'hiver et recoloniser le milieu aquatique au retour de périodes plus favorables à leur croissance [332], [336].

Les résultats de la répartition des *vibrio* selon la saison d'échantillonnage ont montré que les échantillons de loup de mer et la dorade prélevés de la ferme 4, dans la région de Tipaza sont les échantillons où la présence de germes est la plus élevée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la pollution de cette zone qui reçoit des déversements des eaux usées non traitées depuis 5 ans principalement par les effluents non-traités du groupe industrielle tonic. Dans la zone de Boumerdes, 26 souches de vibrions ont été isolées, dont 17 souches dans la ferme F1 et 9 souches seulement dans la ferme de Zemmouri F2, ce qui pourrait être expliqué par la pollution d'origine fécale de l'eau de mer (Cap Djinet) qui alimente les bassins d'élevage de *Dicentrachus labrax* et *Sparus aurata* par les eaux usées (les égouts) qui se déversent directement dans l'eau de mer, par la présence de l'oued de Isser qui débouche dans l'eau de mer de Cap Djinet (environ 500 m) et l'utilisation de l'eau chaude rejetée par la centrale thermique qui se trouve à proximité de cette ferme implique qu'en été, l'eau devient trop chaude (30°C) et commence à avoir un impact positif sur la croissance et la multiplication des germes pathogènes. Par contre aucune souche de *vibrio* n'a été isolée dans la région d'Azzefoune, ce qui pourrait être expliqué par la non contamination de cette zone par les eaux usées.

Les 42 isolats de *Vibrio* isolés dans cette étude ont été détectés que dans les échantillons de poisson d'élevage. Aucun *Vibrio spp* n'a été détecté dans les poissons sauvages, ceci pourrait être attribué à un processus multifactoriel dans lequel :

- Le milieu d'élevage peut subir des changements dans les paramètres physico-chimiques (la salinité, température,...etc) de l'eau de mer de manière à favoriser la

croissance de certaines souches bactériennes, y compris des agents pathogènes [332], [337].

- la densité des poissons élevés dans les bassins ou les cages flottantes de pré grossissement (suite à l'importation de grande quantité d'alevins au même temps (cela est un facteur de stress) et les manipulations de tri qui sont stressantes pour les poissons, ce qui affaiblit leur système immunitaire et les sensibilisent aux agents bactériens, en particulier aux vibrions en survie dans l'eau.

- L'alimentation des poissons d'élevage pourra être aussi une source de contamination [338]. En 2004, une étude avait fait la une des médias. Après analyse de quelques 2 tonnes métriques de saumon à travers le monde, elle indiquait que le saumon d'élevage avait des concentrations beaucoup plus élevées en contaminants organiques que le saumon sauvage [339]. Par contre, en 2017, une nouvelle étude d'une échelle plus réduite indiquait que le taux de contaminants étaient plus élevés dans le saumon sauvage, pêché au large de la Norvège, que dans celui d'élevage [338], suite à l'utilisation d'ingrédients alternatifs dans les aliments du saumon d'élevage par l'utilisation des *huiles végétales et l'huile de colza au lieu la farine et huile de poisson (des aliments qui contiennent des polluants)*.

Il a été observé que les prévalences de contamination entre les deux espèces de poissons (*Sparus aurata* et *Dicentrarchus labrax*) sont comparables, malgré la différence dans le nombre d'échantillonnage. Ceci est confirmé par le test de Student qui indique qu'il n'existe pas de différence significative interespèce ($p > 0,05$). Cela pourrait être expliqué par le fait que ces deux espèces coexistent dans le même environnement et les poissons accumulent passivement à leur surface et au niveau des viscères des contaminants microbiens présents dans l'eau de mer [340], donc, les bactéries de l'eau de mer avaient la réflexion sur la composition bactérienne des branchies et des viscères de ses deux espèces.

2.2.5. Conclusion

Les résultats de cette étude montrent une faible prévalence de contamination des échantillons analysés. Les *vibrios* sont fréquemment isolés des produits de la mer, mais souvent en faible concentration. Le risque sanitaire est alors essentiellement lié à leur capacité à se multiplier après leur récolte. Ces bactéries à croissance rapide ayant un temps de génération de 12 à 18 minutes dans les produits de la mer. Un

produit faiblement contaminé mais stocké dans de mauvaises conditions de température peut rapidement atteindre une dose infectieuse pour l'homme, quelle que soit l'espèce considérée et la voie de contamination.

2.3. LA RECHERCHE DES *VIBRIO* DANS LES MOULES

La consommation des bivalves contaminés constitue un risque de santé publique

2.3.1. Matériel

280 échantillons de mollusques bivalves (*Mytilus galloprovincialis*) ont été collectés de façon aléatoire et simple à partir de six sites de la côte algérienne, sur une période d'une année (du janvier au décembre 2018).

Les échantillons ont été prélevés avec une fréquence mensuelle de 40 échantillons par site, à l'exception du site tonic, où 80 ont été collectés pendant la saison estivale, en particulier après l'épidémie de choléra en Algérie en août 2018.

120 échantillons de moules d'élevage ont été prélevés à partir de trois fermes conchylicoles (sites 1,2,3), tandis que 160 échantillons de moules sauvages ont été prélevés sur des rochers proches du rivage à partir de trois zones (sites 4, 5, 6) de la côte algérienne (figure 2.10, tableau 2.12) :

- **Site 1** : La ferme conchylicole « ORCA marine » de Ain Taya, la wilaya d'Alger (36.791572, 3.306798) (n = 40).
- **site 2** : Le site aquacole (SARL E.A.M) de Ain taghoureit (36.611645, 2. 624503), (n = 40), : est une ferme de poissons (*Discentrarcus labrax* et *Sparus aurata*) et fruits de mer (moules et huitres).
- **site 3** : la ferme conchylicole (SARL El Mokretare) (36.536379, 1.585685) (n = 40): est une ferme conchylicole et piscicole, située à l'ouest de Beni hawa à proximité d'Oued Goussine.
- **site 4** : moulières d'Oued Goussine (36.542806, 1.524142) (n = 40) : sont des moulières qui existe sur un certains nombres de rochers dans la plage de Oued Goussine, wilaya de Chlef.
- **site 5** : Moulières du Vivier (36.650480, 2.691410), (n = 40): *sont des moulières qui existe sur un certains nombres de rochers de la côte de la baie de Bou-Ismaïl, à proximité du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et l'Aquaculture (CNRDPA).*
- **site 6** : Moulières tonic (36.651674, 2.696427), (n = 80) : sont des moulières qui existe sur un certains nombres de rochers à proximité des déversements du groupe tonic, willaya de Tipaza.

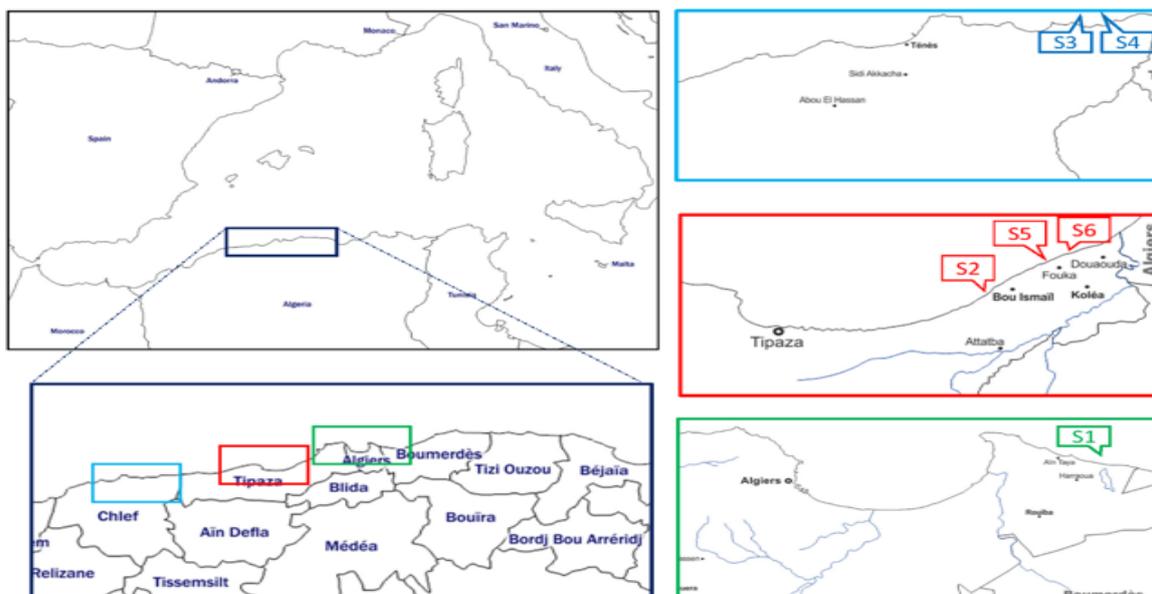


Figure 2.10 : Localisation de la zone d'échantillonnage le long de la côte algérienne. (En bleu, la zone de Chlef : Site 3 et Site 4 ; en vert, la zone d'Alger : Site1 ; en bleu, la zone de Tipaza : Site 2, Site 5 et Site 6).

Tableau 2.12 : répartition des échantillons de moules (*Mytilus galloprovincialis*) d'élevage et sauvage collectés mensuellement de janvier 2018 à décembre 2018.

	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Jui	Jul	Aoû	Sept	Oct	Nov	Dec	To
Site 1	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	40
Site 2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	40
Site 3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	40
Site 4	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	40
Site 5	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	40
Site 6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	80
Tot	21	21	22	22	22	27	27	27	27	22	21	21	

2.3.2. Méthodes

- Technique d'échantillonnage

Chaque prélèvement a été constitué de 10-12 moules, de longueur inférieur à 5 cm. Les prélèvements sont placés dans des sachets stériles et transportés dans une

glacière le plus rapidement possible au laboratoire et analysés sans délai. Les moules ont été soigneusement lavés de manière à éliminer les souillures externes. Après égouttage et un léger flambage, ils ont été ouverts à l'aide d'un couteau stérile conformément à la norme Internationale ISO 7218 :2007 [264] de microbiologie alimentaire. Après ouverture aseptique le contenu entier de la chair plus le liquide inter-valvaire est soumis au broyage par un broyeur type stomacher, pendant 60 s à 230 tr/min.

- Analyses microbiologiques

Les analyses ont été effectuées dans des conditions aseptiques selon la norme ISO / TS 21872-1 : 2007 [265], pour *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* et selon la norme ISO / TS 21872-2 : 2007 [266], pour la détection d'autres espèces de *Vibrio*.

2.3.3. Résultats

Sur un total de 280 échantillons issus des six sites de prélèvement, 51 isolats suspects qui présentaient les caractères biochimiques de *Vibrio* ont été prélevées à partir de 34 échantillons de moules, dont 33 isolats de *V. cholerae* (avec une prévalence de 11,8) et 18 isolats de *V. fluvialis* (avec une prévalence de 6,4 %) (Tableau 2.13).

Tableau 2.13 : les résultats globaux de l'identification microbiologiques des vibrions isolés.

Sites	Mois	L'espèce de <i>vibrio</i> Isolée	No. <i>vibrio</i> identifiés par API20 ^E	MALDI-TOFF SARAMIS	No. <i>vibrio</i> analysé par PCR
Site 5	Juillet	- <i>Vibrio Cholerae</i> (non O1, O139)	5	- <i>Vibrio Cholerae</i> (93%)	2
	Août	- <i>Vibrio fluvialis</i>	6	- <i>Vibrio fluvialis</i> (91%)	1
Site 6	Juillet	- <i>Vibrio Cholerae</i> (non O1, O139)	13	- <i>Vibrio Cholerae</i> (98%)	2
	Août	- <i>Vibrio Cholerae</i> (non O1, O139)	11	- <i>Vibrio Cholerae</i> (95%)	2
		- <i>Vibrio fluvialis</i>	12	- <i>Vibrio fluvialis</i> (94%)	1
	Septembre	- <i>Vibrio Cholerae</i> (non O1, O139)	4	- <i>Vibrio Cholerae</i> (94%)	2
- <i>Vibrio cholerae</i> (O1, O139)		1	- <i>Vibrio cholerae/</i> <i>mimicus</i> (85%)	1	

Parmi les 33 isolats de *Vibrio cholerae* (identifiées biochimiquement), 32 isolats ont été confirmés par MALDI-TOF comme étant *Vibrio cholerae* avec un niveau de confiance > 93%, tandis qu'un seul isolat a été classé comme *Vibrio cholera/mimicus* avec un niveau de confiance > 85%.

Les 18 isolats biochimiquement identifiés comme étant *V. fluvialis* ont été confirmés par l'analyse MALDI-TOF/SARAMIS avec un niveau de confiance > 91% (tableau 2.13).



Figure 2.11 : Electrophorèse sur gel d'agarose du produit d'amplification des isolats de *vibrio* isolés obtenus par PCR classique.

(Colonne S : Marqueur de taille moléculaire de 100 pb ; Colonne N : Contrôle négatif ; Colonne C : contrôle positif (*V. alginolyticus* ATCC 17749) ; colonne 1-11 : échantillons positifs (242 pb); colonne W : contrôle de l'eau).

Les 51 isolats (identifiés biochimiquement) ont été confirmés comme appartenant au genre *vibrio* par PCR (*rpoA*), ou ils ont montré une bande à 242 pb) (Figure 2.11).

Le test sérologique a pu identifier 32 isolats de *Vibrio cholerae non O1, O139* et un isolat seulement de *vibrio cholera* séro groupe O1, biotype Ogawa.

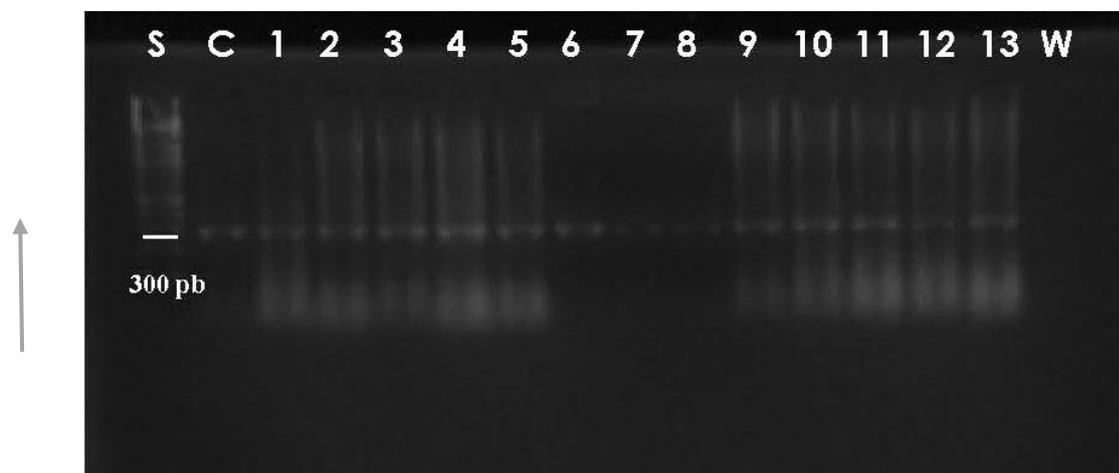


Figure 2.12 : Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *prVC* (300 pb) des isolats de *Vibrio cholerae* isolées.

Colonne S : Marqueur de taille moléculaire de 100 pb ; Colonne N : contrôle négatif ; colonne C : contrôle positif (*Vibrio cholerae* CCUG 37531) ; colonne 1-13 : échantillons positifs (300 pb); colonne W : contrôle de l'eau.

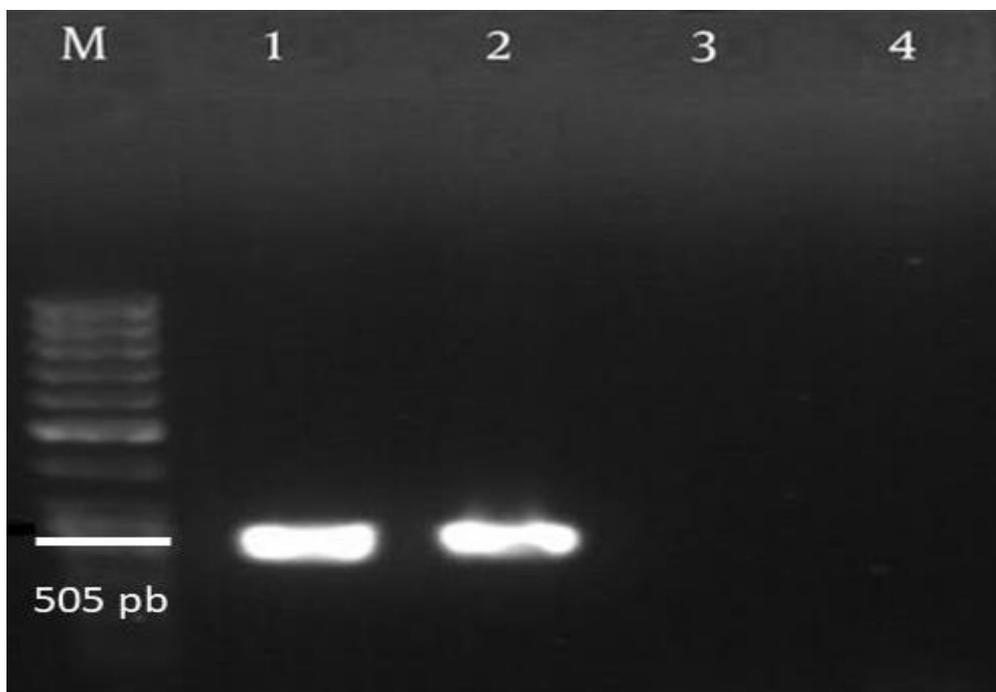


Figure 2.13 : Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *ctxA* (505 pb) de la souche de *Vibrio cholerae* O1.

Colonne M : Marqueur de taille moléculaire de 100 pb ; Colonne 1 : contrôle positif (*Vibrio cholerae* CCUG 37531) Colonne 2 : l'échantillon (505 pb), Colonne 3 : contrôle négatif (*V. alginolyticus* ATCC 17749) et colonne 4 : contrôle de l'eau.

La détection du gène cible *prVC* par PCR a confirmé la présence des 33 isolats de *V. cholerae* (figure 2.12), tandis que le gène de la toxine cholérique (*ctxA*) n'a été trouvé que dans un seul isolat seulement de *vibrio cholerae* O1 (Figure 2.13).

La distribution des différents isolats de *Vibrio* isolés dans les échantillons de *M. galloprovincialis* est résumée dans le tableau suivant (tableau 2.14) :

Tableau 2.14 : Distribution des différents isolats de *Vibrio* isolés dans le *M. galloprovincialis* sauvage dans les sites 5 et 6 de janvier à décembre 2018.

Site et échantillons		Juillet	Août	Septembre	Octobre
S5	n. de souche/ <i>Vibrio</i> isolés	n.5 / <i>V. cholera</i>	n.5/ <i>V. fluvialis</i>	0	0
S6	n. de souche / <i>Vibrio</i> isolés	0	n.13 / <i>V. cholerae</i>	n.11 / <i>V. cholerae</i> n.13 <i>V. fluvialis</i>	n.4 / <i>V. cholera</i>

Dans le site 5, la présence de *Vibrio cholerae* n'a été signalée qu'au mois de juillet 2018 avec une incidence de 66,6%, alors que dans le site 6, elle a été isolé aux mois d'août, septembre et octobre avec un taux d'incidence de 16,25%, 13,75% et 5%, respectivement ; tandis que *Vibrio fluvialis* a été isolé qu'au mois d'août dans le site 5 avec un taux d'incidence 12.5%, et au mois de septembre dans le site 6 avec une incidence de 16,25% (tableau 2.14).

Le taux d'incidence de *Vibrio spp* pour l'ensemble des 280 échantillons analysés était de 12,1 %, tandis que pour les 160 échantillons de moules sauvages, le pourcentage a augmenté jusqu'à 21,2 %.

La distribution des isolats de *Vibrio* isolés chez les moules sauvage et d'élevage dans chaque sites est résumée dans le tableau suivant (tableau 2.15) :

Tableau 2.15 : distribution des isolats de *Vibrio* isolés dans le *M. galloprovincialis* en fonction de type de moule analysé et le site d'échantillonnage.

Espèces	Saison	Moules d'élevage			Moules sauvage			TOT
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	
<i>V. cholera</i>	hiver	0	0	0	0	0	0	0
	printemps	0	0	0	0	0	0	0
	Eté	0	0	0	0	5	24	29
	Automne	0	0	0	0	0	4	4
<i>V. fluvialis</i>	hiver	0	0	0	0	0	0	0
	printemps	0	0	0	0	0	0	0
	Eté	0	0	0	0	5	13	18
	Automne	0	0	0	0	0	0	0
TOT		0	0	0	0	10	41	51

Les isolats de *Vibrio* isolés n'ont été détectés que dans les échantillons sauvages, tandis qu'aucun *Vibrio* n'a été détecté chez les moules d'élevage (tableaux 2.15).

En ce qui concerne la zone d'échantillonnage, les isolats ont été isolés uniquement à partir des moules collectés sur les sites 5 et 6, avec un taux d'incidence de 10 % (n=4) et 37,5 % (n=30), respectivement.

2.3.4. DISCUSSION

La consommation des bivalves contaminés constitue un risque de santé publique majeur [341]. Le mode de nutrition des bivalves par filtration de l'eau de mer, conduit inévitablement à leur contamination par des bactéries, des virus, des toxines et de substances chimiques toxiques présents dans leur environnement [342, 343]. Les moules joueraient donc un rôle prépondérant dans la transmission de diverses affections, et principalement les bactéries qui appartiennent au genre *vibrio*, qui sont considérées comme natives des écosystèmes aquatiques marins et estuariens. [3, 344, 345 et 346].

Les conséquences sanitaires sur la santé humaine et l'impact socio-économique de certains agents pathogènes, en particulier du genre *vibrio*, sont bien documentées. Le risque de maladies infectieuses associées au vibrion est limité à quelques cas par an, mais il devrait augmenter à l'avenir

La prévalence globale de *Vibrio* spp dans notre étude était de 12,1 %. Cette prévalence est inférieure à celle rapportée par Robert Koch Institut en 2016 en France, avec une prévalence de 34,7% [347]. Au Mexique, selon une étude menée de 2012 à 2013, la prévalence global était de 44,3 % [348], en Allemagne (52,5%) selon THI THU TRAVU, et al [349] ; en Suède entre 53- 79% [350], et aux USA entre 20-75% [351]. Cette prévalence est inférieure aux résultats de recherche réalisée par Malainine et al [352], qui ont souligné une faible incidence de *Vibrio* sp (4%) dans les échantillons de fruits de mer prélevés à partir de sites conchylicoles de la lagune de Khnifis au sud du Maroc.

Tandis que chez les moules sauvages, la prévalence était de 21,2 %, alors que selon Woodring et al [353], la prévalence des vibrions était beaucoup plus élevée (92 %),

dans les fruits de mer vendus sur les marchés et les supermarchés de Bangkok, en Thaïlande.

Un produit de mer sauvage libre de tout polluant ou pathogène sera donc plus sain qu'un produit d'élevage, mais un produit d'élevage libre de tout traitement inadéquat sera plus sain que son homologue sauvage affecté par un polluant ou un pathogène. Ce qui pourrait expliquer dans cette étude l'isolement des vibrions uniquement à partir des moules sauvages collectées sur les sites 5 et 6 (willaya de Tipaza). Ces résultats pourraient nous permettent aussi d'émettre l'hypothèse d'une corrélation entre la présence de *V. cholerae* dans ces sites et l'épidémie de choléra signalée, et cela pourrait être attribuée au fait que ces deux sites ont reçu des eaux usées provenant d'installations industrielles voisines situées à proximité de régions particulièrement touchées par l'épidémie de choléra. La présence de Vibrions dans cette zone a également été confirmée par les échantillons de *Sparus aurata* et de *Dicentrarchus labrax* prélevés dans notre étude en mois d'août et octobre 2018.

Selon l'ECDC (2018) [23], la principale cause de l'épidémie de choléra algérien survenue au mois d'août 2018 était une source d'eau potable contaminée qui ne faisait pas partie du réseau d'eau public. L'épidémie s'est propagée sur une vaste zone près de la côte méditerranéenne de l'Algérie, caractérisée par une présence massive d'activité agricole, de sorte que les légumes et les fruits ont également été considérés comme des voies potentielles d'infection.

Sur la base des résultats obtenus, il n'est pas possible d'exclure la contamination de l'environnement marin par des rejets d'eaux usées qui servent de vecteurs aux micro-organismes. Plusieurs études ont isolé des souches de *Vibrio*, y compris des agents pathogènes, le long des environnements côtiers à proximité des rejets d'eaux usées et des eaux de baignade [354], [355], [356], [357], [358].

Le gène *ctx* codant pour l'entérotoxine du choléra a été amplifié dans une souche de *V. cholera* qui a été isolée à partir d'un échantillon de moules prélevé du site 6 en mois de septembre. L'entérotoxine du choléra est le principal facteur de virulence responsable des manifestations cliniques du choléra qui est à l'origine d'un bactériophage filamenteux intégré dans le génome de certaines souches de *V. cholerae*, connu sous le nom de "Cholera Toxin Phage" (CTX). [359], [360].

Plusieurs sérogroupes de *V. cholerae* ont été identifiés sur la base des variations de la structure somatique de l'antigène O. Parmi ceux-ci, presque toutes les souches de *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 sont toxinogènes suite à la présence du gène *ctx* et ont la capacité de produire l'entérotoxine [361]. Les gènes *ctx* sont rarement détectés dans les souches de *V. cholerae* isolées à partir d'échantillons environnementaux, y compris les fruits de mer, qui ne sont pas impliqués dans les épidémies [362]. L'isolement des souches de *V. cholerae* avec le facteur de pathogénicité *ctx* à partir de moules sauvages collectées juste après l'épidémie de choléra souligne la relation entre l'épidémie et la contamination des fruits de mer. Ces gènes de toxine sont mobiles entre les isolats et se propagent dans l'environnement. Il est possible qu'un mécanisme différent de transfert de gènes, tel que le transfert horizontal de gènes entre sérotypes et les modifications génétiques, provoque la transmission de *V. cholerae* dans différentes zones géographiques [259]. Dans une étude en Tunisie, il a été signalé une large distribution des gènes de *V. cholerae* isolés des moules dans le lac de Bizerte [363] et dans la lagune de Monastir-Sayada [364].

Dans de nombreuses études, la fréquence de détection de *V. fluvialis* était très élevée chez les mollusques marins, principalement chez les bivalves, car ils accumulent un grand nombre d'agents pathogènes au cours du processus de l'alimentation par filtration [365], [366]. Dans notre étude, *Vibrio fluvialis* a été isolé avec une prévalence de 6,4 %, nos résultats sont en accord avec ceux de Ripabelli et al [367], qui ont pu isolés *Vibrio fluvialis* chez les mollusques avec une prévalence de 11% en Italie. Alors que, en Afrique du Sud, il a été isolé avec une prévalence de 36,5 % [368].

Vibrio fluvialis est considérée comme l'une des bactéries pathogènes d'origine alimentaire et a été impliquée dans des épidémies et des cas sporadiques de diarrhée [369]. Actuellement, *V. fluvialis* a une importance infectieuse car ses symptômes cliniques de gastro-entérite sont très similaires à ceux de *V. cholerae*. Le problème s'est aggravé après la récente caractérisation d'une hémolysine entérotoxigène de type El Tor chez *V. fluvialis*, qui représente l'un des facteurs de virulence de *V. cholerae* [370].

Dans cette étude, tous les isolats de vibron ont été isolés en été. Le génotype de virulence et le phénotype de ces agents pathogènes associés à l'infection peuvent

différer en fonction des changements climatiques [371]. Certaines études ont montré des schémas saisonniers de transmission de vibrions, un plus grand nombre de ces transmissions se sont produites en été (de juin à septembre) par rapport à l'hiver (Comité scientifique des infections entériques et des maladies d'origine alimentaire, 2011). Aucun vibron n'a été isolé pendant les mois froids. De nombreuses études ont porté sur la manière dont la baisse des températures stresse les vibrions [372], [373], [374]. Un état viable, mais non cultivable (VBNC) a été décrit pour les bactéries lorsqu'elles sont vivantes, mais ne se développent pas sur un milieu de culture [375]. Les bactéries à l'état VBNC peuvent néanmoins être détectées à l'aide de la méthode moléculaire. Pourtant, des études antérieures dans les eaux scandinaves ont donné des résultats différents. Bauer et ses collègues (2006) [376] ont réussi à isoler *V. parahaemolyticus* à partir de *M. edulis* d'élevage lorsque la température de l'eau était aussi basse que 0,6 °C. De Paola et al [377] ont isolé *V. parahaemolyticus* pathogène (*tdh1*) à partir d'huîtres de marché à 7°C.

Les *Vibrio spp.* Potentiellement pathogènes pour l'homme pourraient donc être isolés même à des températures d'eau très basses [378].

2.3.5. Conclusion

Cette étude a permis de mieux connaître la distribution de *Vibrio sp* chez les mollusques en Algérie, en identifiant les lieux et la période où des nombres élevés pourraient être isolés et souligner l'importance d'étendre les analyses de routine à ces bactéries, afin de prévenir d'éventuelles épidémies, dues à la présence d'isolats porteurs de facteurs de virulence.

Nos résultats indiquent que l'incidence de *Vibrio* était plus élevée en été. Cependant, des recherches beaucoup plus approfondies sont nécessaires pour pouvoir prédire quand le nombre de *Vibrio sp* sera élevé ou faible.

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de cette étude, des recherches approfondies ont été menées de janvier 2017 à décembre 2018 pour recueillir des données qualitatives sur la présence d'isolats de *Vibrio* potentiellement pathogène chez les produits de la mer (poissons et moules) sauvages et d'élevage le long de la côte algérienne. En outre, les liens possibles entre la contamination de ces produits de la mer et l'épidémie de choléra survenue en 2018 ont été évalués.

Quatre espèces de *vibrio* ont été isolé chez les poissons (*Dicentrachus labrax* et *Sparus aurata*) , à savoir *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. alginolitycus* et *V. hollisae* et deux espèces seulement ont été isolé chez les moules (*V. cholerae* et *V. fluvialis*). Tous ces résultats nous interpellent quant au danger de la contamination de l'homme par la manipulation ou la consommation de produits de la mer contaminés.

Les toxi-infections alimentaires à vibrions dans les produits de la pêche pourraient être amenées à se développer en raison de l'augmentation de la concentration de ces vibrions dans les eaux côtières consécutivement à l'anthropisation du milieu littoral, au réchauffement planétaire, au changement des habitudes alimentaires avec la consommation des produits de mer crus et à l'augmentation de la proportion des sujets immunodéprimés [379], [8], [380].

Les eaux usées, les déchets rejetés dans la mer, la contamination croisée et la mauvaise hygiène constituent une dangereuse source de contamination directement liée à la santé publique. Ces résultats peuvent être considérés comme des données supplémentaires pour améliorer la qualité des produits halieutiques en Algérie.

Ainsi, ces différents aspects suscitent la détection de ces pathogènes dans les échantillons de produits de la mer qui constituent les principales causes d'intoxication alimentaire et dont le but est d'améliorer les conditions d'hygiène et de manipulation. Cette démarche permet de protéger la santé du consommateur et de valoriser la matière première.

L'étude, la surveillance et la détection des agents pathogènes dans les aliments sont les approches les plus fondamentales pour réduire, contrôler ou prévenir les maladies pathogènes d'origine alimentaire [381], [382].

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

L'étude a permis de montrer l'existence de potentiels facteurs de risque d'infections liés à la consommation de certains produits de mer en Algérie. La consommation de ces produits crus ou insuffisamment cuits, nous interpelle plus que jamais, à émettre des recommandations à l'adresse des pisciculteurs, des vétérinaires, des médecins, des vendeurs et des consommateurs de ces aliments.

Pour le pisciculteur on préconise l'utilisation des conduites à double paroi ce qui permet de maintenir la température stable de l'eau apportée. Cette double paroi joue un rôle important lors de la prise d'eau non réchauffée (au large), ce qui va permettre de régler le problème de température très élevée de l'eau en été, de la turbidité et de la contamination fécale.

Les autorités doivent sensibiliser les commerçants aux bonnes pratiques d'hygiène afin de réduire la multiplication de ces germes. En effet les commerçants doivent vendre les poissons dans des récipients propres et désinfectés avant et après chaque vente, ainsi que mettre les poissons dans la glace pour maintenir leur température de vente.

Les consommateurs doivent faire correctement cuire les poissons et les fruits de mer pour éviter une multiplication éventuelle des germes pathogènes à la santé humaine. Il faudra qu'ils évitent de mélanger ces produits avec d'autres aliments dans le panier de la ménagère ou de les conserver au réfrigérateur au contact des autres aliments à cause de la contamination croisée entre les produits de la mer contaminés par d'autres germes et les autres aliments.

La prévention passe également par la surveillance continue des zones aquacoles et conchylicoles et formation et sensibilisation des médecins afin qu'ils informent leurs patients présentant une pathologie prédisposante (sida, cirrhose de foie) du risque auquel ceux-ci s'exposent lors d'un contact avec la mer, la manipulation ou la consommation de produits de mer.

Une surveillance bactériologique des produits de la pêche est nécessaire pour prévenir les infections à *Vibrio* d'origine alimentaire et nécessite l'amélioration des méthodes de détection et de caractérisation des espèces de *Vibrio* pathogènes pour

l'homme par voie digestive. Ainsi l'utilisation des réactions d'amplification génique (PCR) assure, non seulement une meilleure spécificité que les techniques bactériologiques classiques pour la détermination de l'espèce, mais permet également la mise en évidence des différents gènes de pathogénicité des espèces principalement associées au risque *Vibrio* dans les produits de la mer.

L'adoption des techniques PCR pour la détection des isolats de *Vibrio* porteuses des gènes de pathogénicité est donc indispensable pour statuer sur la salubrité des produits de la pêche destinés à la consommation. Une amélioration de la technique serait de pouvoir l'appliquer directement sur les produits de la pêche, de façon à réduire les délais d'étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Festy B., Hartemann P., Ledrans M., Levallois P., Payment P., Tricard D., "Qualité de l'eau in : Environnement et santé publique-Fondements et pratiques : "", Édisem / Tec & Doc, Paris, (2003), 333-368.
2. Diop M.B., Destain J., Tine E., Thonart P., "Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation", *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, V. 14, n° 2, (2010), 341-350.
3. Ceccarelli D., Amaro C., Romalde J. L., Suffredini E., Vezzulli L., "Vibrio species. In: Food Microbiology: Fundamentals and frontiers, American Society for Microbiology", M.P. Doyle Francisco, F. Diez-Gonzalez, C. Hill (Eds.), New York, (2019), 347-388.
4. Destoumieux-Garzón D., Canesi L., Oyanedel D., Travers M.A., Charrière G.M., Pruzzo C., Vezzulli L., "Vibrio-bivalve interactions in health and disease", *Environ. Microbiology*, (2020), 19.
5. Lee L.H., Ab Mutalib N.S., Law J.W.F., Wong S.H., Letchumanan V., "Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwater fish", *Frontiers in Microbiology*, V. 9, (2018), 2513.
6. Ford C.L., Powell A., Lau D.Y.L., Turner A.D., Dhanji-Rapkova M., Martinez-Urtaza J., Baker-Austin C., "Isolation of and characterisation of potentially pathogenic *Vibrio* species in a temperate, higher latitude hotspot", *Environ. Microbiol. Rep.* V. 12, (2020) 424-434. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12858>.
7. Osunla C.A., Okoh A.I., "Vibrio pathogens: A public health concern in rural water resources in Sub-Saharan Africa", *Int J Environ Res Public Health*, V. 14, n° 10, (2017), 1188. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101188>
8. Baker-Austin C., Oliver J.D., Alam M., Ali A., Waldor M.K., Qadri F., Martinez-Urtaza J., "*Vibrio* spp. infections", *Nat. Rev. Dis. Primers*, V. 4, n° 1, (2018), 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>.

9. Cohn S., Kutalek R., Historical parallels., “Ebola virus disease and cholera: understanding community distrust and social violence with epidemics“, PLoS currents, V. 8, n° 1, (2016), 182. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.aa1f2b60e8d43939b43fbd93e1a63a94>
10. Maraki S., Christidou A., Anastasaki M., Scoulica E., “ Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteremic skin and soft tissue“, infections. Infect. Dis, V. 48, n° 6, (2016), 171-176. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1104720>.
11. Zhao W., Caro F., Robins W., Mekalanos J.J., “Antagonism toward the intestinal microbiota and its effect on *Vibrio cholerae* virulence“, Science, V. 359, n° 6372, (2018), 210-213. <https://doi.org/10.1126/science.aap8775>
12. Chatterjee S., Ghosh K., Raychoudhuri A., Chowdhury G., Bhattacharya M.K., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Klose K.E., Nandy R.K., “Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India“, J. Clinical Microbiol, V. 47, n° 4, (2009), 1087-1095. <https://doi.org/10.1128/JCM.02026-08>.
13. Tsai Y.H., Huang T.J., Hsu R.W.W., Weng Y.J., Hsu W.H., Huang K.C., Peng K.T., “Necrotizing soft-tissue infections and primary sepsis caused by *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* non-O1“, J. Trauma Acute Care Surg, V. 66, n° 3,(2009) 899-905. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31816a9ed3>
14. Slifka K.J., Newton A.E., Mahon B. E., “*Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012“, Epidemiol. Infect, V. 147, n° 7, (2017), 1491-1499. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000140>
15. Phillips K.E., Satchell K.J., “ *Vibrio vulnificus*: from oyster colonist to human pathogen“, PLoS pathogens, V. 13, n° 1, (2017),, e1006053. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006053>
16. Nguyen T.V., Alfaro A.C., Merien F., Young T., Grandiosa R., “ Metabolic and immunological responses of male and female newZealand Greenshell™ mussels

- (*Perna canaliculus*) infected with *Vibrio* sp“ J. Invertebr. Pathol, V. 157, (2018), 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.008>.
17. Sabir, M., Moulay, M.E. and Nozha, C., “*Vibrio alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases“, *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, V. 2, n° 4, (2013), 302-309.
 18. Gomez-Léon, J., Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B. and Figueras A., “Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities“, *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 71., (2005) ,98-104.
 19. Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B. and Rediers, H. “*Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention“, *J. Fish Di*, V. 34, n° 9, (2011), 643–661.
 20. Bakhrouf, A., Jeddi, M. and Ben Ouada, H., “Essai de traitement des vibrioses du loup *Dicentrarchus labrax* dans une zone de pisciculture, à Monastir, Tunisie“, *Marine Life*, V. 5, n° 2, (1995), 47-54.
 21. Zorilla, I., Moriñigo, M.A., Castro, D., Balebona, M.C. and Borrego, J.J., “Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain“, *J. Appl. Microbiol.*, V. 95, n° 5, (2003), 1106-1116.
 22. Scarano, C., Spanu, C., Ziino, G., Pedonese, F., Dalmasso, A., Spanu, V., Viridis, S. and De Santis, E.P.L., “Antibiotic resistance of *Vibrio* species isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture“, *New Microbiologica*, V. 37, n°3, (2014), 329-337.
 23. ECDC, . European Centre for Disease Prevention and Control., “Cholera outbreak in Algeria, 2018 “,Stockholm: ECDC, (7 September 2018), PDF – 741.36.
 24. Fournier et Quilici., “Infections à Vibrions non cholériques“, *Encycl Méd Chir*, Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Maladies infectieuses, 8-026-F-15, Paris, (2002), 7.

25. Sakazaki R., Iwanami S., Fukumi H., "Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*, (Morphological, cultured and biochemical properties and its taxonomical position", *Japan Journal of Medical Science and Biology*, V. 16, (1963), 161-188.
26. Travers, M.A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I., Saulnier, D., "First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events", *J. Invertebr. Pathol.* V. 123, (2014), 38–48. doi:10.1016/j.jip.2014.04.009.
27. Reichelt J.L., Baumann P., Baumann L., "Study of genetic Relationships among marine species of the genera *Beneckea* and *Photobacterium* by means of in vitro DNA/DNA hybridization", *Arch. Microbiol.*, V. 110, (1976), 101-120.
28. Maurin C., LeDantec., "The culture of *Crassostrea gigas* in France", In: Mann R (ed) *Exotic species in mariculture*. The MIT Press, Cambridge, (1979), 106–122.
29. ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods., "Characteristics of Microbial Pathogens. London". ICMS. *Microorganisms in Foods* Blackie Academic and Professional, V. 5, (1996),
30. FAO/WHO., "Food Safety Consultation, Risk assessment of *Campylobacter* spp in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood», Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bangkok-Thailand, (2002), 59.
31. Alsina, M., Blanch, A.R., "A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species», *J. Appl. Bacteriol.* V.76, (1994), 79–85. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb04419.x.
32. Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J.L., Gouy M. et Berthe F., "Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences". *Diseases of Aquatic Organisms*. V. 58, (2004), 143-50.
33. Le Roux F. et Austin B. *Vibrio splendidus*. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., "In *The Biology of Vibrios*". ASM Press, Washington, DC. (2006), 285-296.

34. Owens L. et Busico-Salcedo N. *Vibrio harveyi*: Pretty problems in paradise. Ed. Thompson F.L., Austin B. et Swings J., "In The biology of Vibrios". Washington, DC. (2006), 266-280.
35. Kita-Tsukamoto K., Oyaizu H., Nanba K. et Simidu U., "Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences". *International Journal of Systematic Bacteriology*. V. 43, (1993), 8-19.
36. Ruimy, R., V. Breittmayer, P., Elbaze, B., Lafay, O., Boussemart, M., Gauthier and R Christen., "Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences», *Int. J. Syst. Bact.* V. 44, (1994), 416-426.
37. Thompson F.L., Lida T. et Swings J., "Biodiversity of Vibrios". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. V. 68, (2004), 403-31.
38. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kampfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. et Whitman W.B., "Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. V. 52, (2002), 1043-1047.
39. Thompson J.R., Randa M.A., Marcelino L.A., Tomita-Mitchell A., Lim E. et Polz M.F., "Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community". *Applied and Environmental Microbiology*. V. 70, (2004), 4103-10.
40. Sawabe, Tomoo, Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A.R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, Toko, Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., Hayashi, T., "Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny:

- proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* spⁿ. nov. *Front. Microbiol.* V. 4, (2013), doi:10.3389/fmicb.2013.00414.
41. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. et Swings J., "Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics», *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* V. 60, (1996),407-438.
42. Travers, M.A., Boettcher Miller, K., Roque, A., Friedman, C.S., "Bacterial diseases in marine bivalves". *J. Invertebr. Pathol.* V. 131, (2015),11-31. doi:10.1016/j.jip.2015.07.010.
43. McCarter, L., "The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*», *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* V. 1, (1999), 51–57.
44. Wall, D., Kaiser, D., "Type IV pili and cell motility», *Mol. Microbiol.* V. 32, (1999), 01-10. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01339.x
45. Watnick, P.I., Kolter, R., "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm», *Mol. Microbiol.* V.34, (1999), 586–595.
46. Lambert, C., "Etude des infections à Vibrionaceae chez les mollusques bivalves à partir d'un modèle larves de *Pecten maximus*". UEB - Université européenne de Bretagne. Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B., Colwell, R.R., "Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay», *Appl. Environ. Microbiol.* V. 68, (2002), 5498–5507.
47. Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D. & other authors., "DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholera*". *Nature.* V. 406, (2000), 477–483.
48. Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, T., Uda, K., Tagomori, Y., Iijima, M., Najima, M., Nakano, A., Yamashita, Y., Kubota, S., Kimura, T., Yasunaga, T., Honda, H., Shinagawa, M., Hattori, and Iida. T., "Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholera*". *The Lancet.* V. 361, (2003), 743-749.

49. Chen, C., K. Wu, Y., Chang, C., Chang, H., Tsai, T. Liao, Y., Liu, H. Chen, A. B., Shen, J., Li, T., Su, C., Shao, C., Lee, L., Hor, and Tsai. S., 2003. "Comparative Genome Analysis of *Vibrio vulnificus*, a Marine Pathogen". *Genome Res.* V. 13, (2003), 2577-2587.
50. Yamaichi Y., Iida T., Park K.S., Yamamoto K. et Honda T., "Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species», *Mol Microbiol.* V. 31, (1999), 1513-21.
51. Waldor M.K. et RayChaudhuri D., "Bacterial genomics: Treasure trove for cholera research". *Nature.* V. 406, (2000), 469-470.
52. Tantilillo, G. m., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., Musti, M., "Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections". *Lett. Appl. Microbiol.* V. 39, (2004), 117–126. doi:10.1111/j.1472- Toranzo Toranzo 765X.2004.01568.x
53. Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., 2014. "Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique», *Can. J. Vet. Res.* V. 78, (2014), 110–116.
54. Rosenberg, E., Falkovitz, L., "The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching», *Annu. Rev. Microbiol.* V. 58, (2004), 143–159. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123610.
55. Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, Indrani, Nishibuchi, M., Karunasagar, Iddya, "The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments, implications for food safety», *Int. J. Food Microbiol.* V. 102, (2005), 151–159. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.011.
56. Kim, Y.W., Lee, S.H., Hwang, I.G., Yoon, K.S., "Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat», *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* V. 9, (2012), 4662–4675. doi:10.3390/ijerph9124662.
57. Randa, M.A., Polz, M.F., Lim, E., 2004. "Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR". *Appl.*

- Environ. Microbiol. V. 70, (2004), 5469–5476. doi:10.1128/AEM.70.9.5469-5476.2004.
58. Yildiz, F.H., Visick, K.L., 2009. “Vibrio biofilms: so much the same yet so different”. Trends Microbiol. V. 17, (20089), 109–118. doi:10.1016/j.tim.2008.12.004
59. Donlan, R.M., Costerton, J.W., “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”. Clin. Microbiol. Rev. V. 15, (2002), 167–193.
60. Nilsson, L., Oliver, J.D., Kjelleberg, S., “Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state», J. Bacteriol. V. 173, (1991), 5054–5059.
61. Zhong, L., Chen, J., Zhang, X., Jiang, Y., “Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation”. Lett. Appl. Microbiol. V. 48, (2009), 247–252. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02522.x
62. Chaiyanan, Saipin, Chaiyanan, Sitthipan, Grim, C., Maugel, T., Huq, A., Colwell, R.R., 2007. “Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*», Environ. Microbiol. V. 9, (2007), 393–402. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01150.x
63. Casadevall, A., Pirofski, L., 1999.” Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity”. Infect. Immun. V. 67, (1999), 3703–3713.
64. Lee, R.J., Younger, A.D., “Developing microbiological risk assessment for shellfish purification”. Int. Biodeterior. Biodegrad, Risk Assessment. V. 50, (2002), 177–183. doi:10.1016/S0964-8305(02)00084-7.
65. Toti, L., Serratore, P., Croci, L., Stacchini, A., Milandri, S., Cozzi, L., 1996. “Bacteria isolated from seawater and mussels: Identification and toxin production, in: M.A.N. microbiologie, aliments, nutrition», Presented at the Journées d’Etudes du Collège International Alexandre Tessier, Société informations études et édition en nutrition et alimentation. (1996), 161–165.
66. Ceccarelli, D., Spagnoletti, M., Cappuccinelli, P., Burrus, V. & Colombo, M. M. “Origin of *Vibrio cholerae* in Haiti”. Lancet Infect Dis. V. 11, (2011), 262.
67. Pfrimmer, D. M., “Cholera in Haiti», J Contin Educ Nurs. V. 41, (2010), 536–537.

68. Tappero, J. & Tauxe, R., "Lessons Learned during Public Health Response to Cholera Epidemic in Haiti and the Dominican Republic". *Emerg Infect Dis.* V. 17, (2011), 2087-93.
69. Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B., Siddique A.K., "Cholera". *Lancet.* V. 363, (2004), 223-233.
70. Lipp, E. K., Huq, A. & Colwell, R. R., "Effects of global climate on infectious disease: the Cholera model», *Clin Microbiol Rev.* V 15, n° 4, (2002), 757-770.
71. Islam, M., Mahmuda, S., Morshed, M., Bakht, H., Khan, M., Sack, R. & DA, D. S., "Role of cyanobacteria in the persistence of *Vibrio cholerae* O139 in saline microcosms". *Can J Microbiol.* V.50, (2004), 127-131.
72. Halpern, M., Raats, D., Lavion, R. & Mittler, S., "Dependent population dynamics between chironomids (nonbiting midges) and *Vibrio cholera*". *FEMS Microbiol Ecol.* V. 55, (2006), 98-104.
73. Gulig, P. A., Bourdage, K. L. & Starks, A. M., "Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*". *J Microbiol.* V. 43, (2005), 118-13.
74. Horseman, M.A., Surani, S., "A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection". *Int. J. Infect. Dis.* V. 15, n° 3, (2011), 157–166. doi:10.1016/j.ijid.2010.11.003.
75. Barker, W.H., Gangarosa, E.J., "Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*". *Annu. Rev. Med.* V. 25, (1974), 75–81. doi:10.1146/annurev.me.25.020174.000451.
76. Raghunath, P., "Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*". *Front. Microbiol.* V. 5, (2015), 805. doi:10.3389/fmicb.2014.00805.
77. Suthienkul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M., Honda, T., "Urease production correlates with possession of the *trh*

- gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand», *J. Infect. Dis.* V. 172, (1995), 1405–1408.
78. Raimondi, F., Kao, J.P., Fiorentini, C., Fabbri, A., Donelli, G., Gasparini, N., Rubino, A., Fasano, A., “Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems», *Infect. Immun.* V. 68, (2000), 3180–3185.
79. Velazquez-Roman, J., León-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Villafaña-Rauda, S., Canizalez-Roman, A., “Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010”. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 78, (2012), 1794–1803. doi:10.1128/AEM.06953-11.
80. Kaufman, G.E., Myers, M.L., Pass, C.L., Bej, A.K., Kaysner, C.A., “Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks”. *Lett. Appl. Microbiol.* V. 34, (2002), 155–161.
81. Bag, P.K., Nandi, S., Bhadra, R.K., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Nishibuchi, M., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nair, G.B., “Clonal diversity among recently rmerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread», *J. Clin. Microbiol.* V. 37, (1999), 2354–2357.
82. Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruise, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M., Slutsker, L., “*Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States, 1973–1998», *J. Infect. Dis.* V. 181, (2000), 1661–1666. doi:10.1086/315459.
83. Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., Pousa, A., “Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6”, *Europe. Emerg. Infect. Dis.* V. 11, (2005), 1319–1320. doi:10.3201/eid1108.050322.

84. Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J., Nishibuchi, M., “Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed pcr and toxrs sequence analyses”. *J. Clin. Microbiol.* V. 38, (2000), 578–585.
85. Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y. & Sack, D. A. “Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants», *Clin Microbiol Rev.* V. 20, (2007), 39–48.
86. Toyofuku, H., “*Vibrio parahaemolyticus* Risk Management in Japan”, in: Sauv e, G. (Ed.), *Molluscan Shellfish Safety*, Netherlands. (2014), 129–136. doi:10.1007/978-94-007-6588-7_11
87. Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprerthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C., Nishibuchi, M., “Isolation of a Pandemic O3:K6 Clone of a *Vibrio parahaemolyticus* Strain from environmental and clinical sources in Thailand”. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 66, (2000), 2685–2689. doi:10.1128/AEM.66.6.2685-2689.2000.
88. Vandenberghe, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. & Swings, J., “diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems”. *Aquaculture.* V. 219, (2003), 9–20.
89. Buller, N. B., “Bacteria from fish and other Aquatic animals: a practical identification manual», CABI publishing. (2004), 67-73.
90. Pedersen, K., Grisez, L., Houdt, R. v., Tiainen, T., Ollevier, F. & Larsen, J. L., “Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional”. O-serogroups, *Curr Microbiol.* V. 38, (1999), 183-189.

91. Bruno, D., Hastings, T., Ellis, A., "Histopathology, bacteriology and experimental transmission of cold-water vibriosis in Atlantic salmon *Salmo salar*". *Dis. Aquat. Organ.* V. 1, (1985), 163–168. doi:10.3354/dao001163.
92. Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A., Hjeltnes, B., "Vibrio salmonicida sp.nov, a new fish pathogen», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 36, (1986), 518–520. doi:10.1099/00207713-36-4-518.
93. Sørum, H., Hvaal, A.B., Heum, M., Daae, F.L., Wiik, R., "Plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* for epidemiological studies of cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*), *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, (1990), 1033–1037.
94. Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., "A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems". *Aquaculture.* V. 246, (2005), 37–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.002.
95. Reimschuessel, R., Stoskopf, M.K., Bennett, R.O., "Myocarditis in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*)», *J. Comp. Pathol.* V. 102, (1990), 291–297.
96. Sangster, C.R., Smolowitz, R.M., "Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*". *Biol. Bull.* V. 205, (2003), 233–234.
97. Farto, R., Armada, S.P., Montes, M., Guisande, J.A., Pérez, M.J., Nieto, T.P., "Vibrio lentus associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*)», *J. Invertebr. Pathol.* V. 83, (2003), 149–156.
98. Li, T.W., Ding, M.J., Zhang, J., Xiang, J.H., Liu, R.Y., "Studies on the 610 pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast", *J. Shellfish Res.* V. 17, (1998), 707-711.

99. Nicolas, J.L., Basuyaux, O., Mazurié, J., Thébault, A., "Vibrio carchariae, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*". *Dis. Aquat. Organ.* V. 50, (2002), 35–43. doi:10.3354/dao050035.
100. Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J., "Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs», *Environ. Microbiol. Rep.* V. 2, (2010), 34–43. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x
101. Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., "Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution», *Aquat. Living Resour.* V. 17, (2004), 477–498. doi:10.1051/alr:2004054.
102. Romalde, J.L., Dieguez, A.L., Lasa, A., Balboa, S., "New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota". a review. *Front. Microbiol.* V. 4, (2014), doi:10.3389/fmicb.2013.00413
103. Romalde, J.L., Barja, J.L., "Bacteria in molluscs: Good and bad guys. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol*», Mendez-Vilas Ed Formatex Res Cent. (2010), 136–147.
104. Guisande, J.A., Montes, M., Farto, R., Armada, S.P., Pérez, M.J., Nieto, T.P., "A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusc production". *Journal of Shellfish Research.* V. 23, (2004), n°2, 599-609.
105. Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J., Barja, J.L., "Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen". *Dis. Aquat. Organ.* V. 67, (2005), 209–215. doi:10.3354/dao067209.
106. Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., "A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity". *Microb. Ecol.* V. 59, (2010), 787–798. doi:10.1007/s00248-009-9620-y.

107. Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charrière, G.M., Le Roux, F., Goudenège, D., Gourbal, B., Kieffer-Jaquinod, S., Couté, Y., Wai, S.N., Destoumieux-Garzón, D., “Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells», *Environ. Microbiol.* V. 17, (2015), 1152–1165. doi:10.1111/1462-2920.12535.
108. Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., Le Roux, F., “Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters”. *ISME J.V.* 9, (2015), 1523–1531. doi:10.1038/ismej.2014.233.
109. Gay, M., Renault, T., Pons, A.M., Le Roux, F., “Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations», *Dis. Aquat. Organ.* V. 62, (2004), 65–74. doi:10.3354/dao062065.
110. Wang, Z., Lu, X., Liang, Y., Wang, C., “*Haplosporidium nelsoni* and *H. costale* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from China’s coasts”. *Dis. Aquat. Organ.* V. 89, (2010), 223–228. doi:10.3354/dao02196.
111. Davis, J.W., Sizemore, R.K., 1982. “Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas”. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 43, (1982), 1092–1097.
112. Welsh, P.C., Sizemore, R.K., “Incidence of bacteremia in stressed and unstressed populations of the blue crab, *Callinectes sapidus*», *Appl. Environ. Microbiol.* V. 50, (1985), 420–425.
113. Rivera, A., Santiago, K., Torres, J., Sastre, M.P., Rivera, F.F., “Bacteria associated with hemolymph in the crab *Callinectes bocourti* in Puerto Rico», *Bull. Mar. Sci.* V. 64, (1999), 543–548.

114. Newman, M.C., Feng, S.Y., "Susceptibility and resistance of the rock crab, *Cancer irroratus*, to natural and experimental bacterial infection". *J. Invertebr. Pathol.* V. 40, (1982), 75–88. doi:10.1016/0022-2011(82)90039-8.
115. Porter, L., Butler IV, M., Reeves, R.H., "Normal bacterial flora of the spiny lobster *Panulirus argus* and its possible role in shell disease», *Mar. Freshw. Res.* V. 52, (2001), 1401–1405.
116. Diggles, B.K., Carson, J., Hine, P.M., Hickman, R.W., Tait, M.J., "Vibrio species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand», *Aquaculture.* V. 183, (2000), 1–12. doi:10.1016/S0044-8486(99)00280-X.
117. Robertson PAW., Calderon J ., Carrera L ., Stark JR ., Zherdmant M, Austin B., "Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae", *Dis Aquat Org.* V. 32, n°2, (1998), 151-155. [http:// dx.doi.org/10.3354/dao032151](http://dx.doi.org/10.3354/dao032151).
118. Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R., "Characterization of *Vibrio* spp. Associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India)», *J. World Aquac. Soc.* V. 37, (2006), 523–532. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x
119. Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A.L., Martin, C., Martin, B., "Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp», *Dis. Aquat. Organ.* V. 40, (2000), 101–107. doi:10.3354/dao040101.
120. Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture.* V. 253, (2006), 105–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.031
121. Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., Decker, S. de, Saulnier, D., Roux, F. le., "Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid

- shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia», *Syst. Appl. Microbiol.* V. 29, (2006), 570–580. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.005
122. Rosenberg, E., Loya, Y., “Coral Health and Disease», Springer Science & Business Media. (2013).
123. Rubio-Portillo, E., Yarza, P., Peñalver, C., Ramos-Esplá, A.A., Antón, J., “New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp” communities. *ISME J.* V. 8, (2014), 1794–1807. doi:10.1038/ismej.2014.33
124. Sutherland, K.P., Porter, J.W., Torres, C., “Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals», *Mar. Ecol. Prog. Ser.* V. 266, (2004), 273–302. doi:10.3354/meps266273.
125. Rosenberg, E., Ben-Haim, Y., “Microbial diseases of corals and global warming. *Environ. Microbiol.* V. 4, (2002), 318–326.
126. Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., Haim, Y.B., Loya, Y., “Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1”. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* V. 171, (1998), 131–137. doi:10.3354/meps171131.
127. Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., Rosenberg, E., “*Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 51, (2001), 1383–1388. doi:10.1099/00207713-51-4-1383.
128. Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E., Rosenberg, E., “Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*», *Appl. Environ. Microbiol.* V. 66, (2000), 3031–3036. Références 191
129. Banin, E., Khare, S.K., Naider, F., Rosenberg, E., “Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae», *Appl. Environ. Microbiol.* V. 67, (2001), 1536–1541. doi:10.1128/AEM.67.4.1536-1541.2001.
130. Ben-Haim, Y., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J., Rosenberg, E., “*Vibrio coralliilyticus* sp. nov, a temperature-dependent

- pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 53, (2003), 309–315. doi:10.1099/ijs.0.02402-0.
131. Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E., "Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*", *Appl. Environ. Microbiol.* V. 69, (2003), 4236–4242. doi:10.1128/AEM.69.7.4236-4242.2003.
132. Ben-Haim, Y., Rosenberg, E., "A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*", *Mar. Biol.* V. 141, (2002), 47–55. doi:10.1007/s00227-002-0797-6.
133. Rubio-Portillo, E., Yarza, P., Peñalver, C., Ramos-Esplá, A.A., Antón, J., "New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp". communities. *ISME J.* V. 8, (2014), 1794–1807. doi:10.1038/ismej.2014.33.
134. Cervino, J. M., Hayes, R. L., Polson, S. W., Polson, S. C., Goreau, T. J., Martinez, R. J. & Smith, G. W., "Relationship of *Vibrio* Species infection and elevated temperatures to Yellow Blotch/Band Disease in Caribbean corals", *Appl Environ Microbiol.* V. 70, (2004), 6855-6864.
135. Smith, H., "Microbial surfaces in relation to pathogenicity". *Bacteriol Rev.* V 41, (1977), 475–500.
136. Casadevall, A. & Pirofski, L., "Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism". *Trends Microbiol.* V. 11, (2003), 157–158.
137. Shapiro-Ilan, D. I., Fuxa, J. R., Lacey, L. A., Onstad, D. W. & Kaya, H. K., "Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology", *J Invertebr Pathol.* V. 88, (2005), 1–7.
138. Thomas, S. R. & Elkinton, J. S., "Pathogenicity and virulence". *J Invertebr Pathol.* V. 85, (2004), 146–151.

139. Schaechter, M., Medoff, G. & Eisenstein, B. I., "Microbiologie et pathologie infectieuse". De Boeck Supérieur. (1999),
140. Pallen M.J. et Wren B.W., "Bacterial pathogenomics". *Nature*. V. 449, (2007), 835-842.
141. Furuya E.Y. et Lowy F.D., "Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting". *Nature Reviews Microbiology*. V. 4, (2006), 36-45.
142. Garcia-Vallve S., Guzman E., Montero M.A. et Romeu A., "HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes". *Nucleic Acids Research*. V. 31, (2003), 187-189.
143. Nakamura Y., Itoh T., Matsuda H. et Gojobori T., "Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes», *Nature Genetics*. V. 36, (2004), 760-766.
144. Davies J., "Origins and evolution of antibiotic resistance», *Microbiologia* .V. 12, (1996), 9-16.
145. Doolittle W.F., "Lateral genomics», *Trends in Cell Biology*. V. 9, (1999), 5-8.I.
146. Finlay, B. B. & Falkow, S., "Common themes in microbial pathogenicity revisited», *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. V. 61, (1997), 136–169.
147. Casadevall, A. & Pirofski, L.A., (2009), "Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework". *J Water Health*. V. 7, n° 1, (2009),2–18.
148. Austin, B., "Vibrios as causal agents of zoonoses», *Vet Microbiol*, V 140, (2010), 310–317.
149. Yorimitsu, T. & Homma, M., "Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio*», *Biochim Biophys Acta BBA – Bioenerg*. V. 1505, (2001), 82–93.

150. O'Toole R., Lundberg S., Fredriksson S.A., Jansson A., Nilsson B. et Wolf-Watz H., "The Chemotactic Response of *Vibrio anguillarum* to Fish Intestinal Mucus Is Mediated by a Combination of Multiple Mucus Components". *Journal of Bacteriology*. V. 181, (1999), 4308-4317.
151. Parkinson J.S., Ames P. et Studdert C.A., "Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors". *Current Opinion in Microbiology*. V 8, (2005), 116-121.
152. McCarter L.L., "Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. V. 65, (2001), 445-462.
153. Ran Kim Y. et Haeng Rhee J., "Flagellar basal body flg operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 304, (2003), 405-410.
154. O'Toole R., Milton D.L. et Wolf-Watz H., "Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*". *Molecular Microbiology*. V. 19, (1996), 625-637.
155. Gardel C.L. et Mekalanos J.J., "Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression», *Infection and Immunity*. V. 64, (1996), 2246-2255.
156. Bardy S.L., Ng S.Y. et Jarrell K.F., "Prokaryotic motility structures". *Microbiology*. V. 149, (2003), 295-304.
157. Kovach M.E., Shaffer M.D. et Peterson K.M., "A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*», *Microbiology*. V. 142, (1996), 2165-2174.
158. Tacket C.O., Taylor R.K., Losonsky G., Lim Y., Nataro J.P., Kaper J.B. et Levine M.M., "Investigation of the roles of Toxin-Coregulated Pili and Mannose-Sensitive

- Hemagglutinin Pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection”. *Infection and Immunity*. V. 66, (1998), 692-695.
159. Attridge S.R., Manning P.A., Holmgren J. et Jonson G., “Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor», *Infection and Immunity*. V. 64, (1996), 3369-3373.
160. Sperandio, V., Giron, J. A., Silveira, W. D., Kaper, J. B., “The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholera*”. *Infect. Immun.* V. 63, (1995), 4433–4438.
161. Paranjpye R.N., Lara J.C., Pepe J.C., Pepe C.M. et Strom M.S., “The Type IV Leader Peptidase/NMethyltransferase of *Vibrio vulnificus* Controls Factors Required for Adherence to HEp-2 Cells and Virulence in Iron-Overloaded Mice”. *Infection and Immunity*. V. 66, (1998), 5659-5668.
162. Paranjpye R.N. et Strom M.S., “A *Vibrio vulnificus* Type IV Pilin Contributes to Biofilm Formation, Adherence to Epithelial Cells, and Virulence», *Infection and Immunity*. V. 73, (2005), 1411-1422.
163. Donnenberg M.S., “Pathogenic strategies of enteric bacteria”. *Nature*.V. 406, (2000), 768-774.
164. Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., Wakae, H., Rahman, M. & Tomochika, K.-I., “Bacterial Proteases as Pathogenic Factors, with Special Emphasis on *Vibrio* Proteases», *Toxin Rev.* V. 15, (1996), 327–339.
165. Miyoshi, S., Sonoda, Y., Wakiyama, H., Rahman, M.M., Tomochika, K., Shinoda, S., Yamamoto, S., Tobe, K., “An exocellular thermolysin-like metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification, characterization, and gene cloning», *Microb. Pathog.* V. 33, (2002), 127–134.

166. Mersni-Achour, R., "Vibrio tubiashii en France : description d'isolats pathogènes affectant des mollusques et étude de leurs mécanismes de virulence", Thèse de Doctorat ,)Sciences agricoles. Université de La Rochelle. (2014), 63- 73.
167. Wandersman C. et Delepelaire P., "Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annual»,Review of Microbiology. V. 58, (2004), 611-647.
168. Binesse J., Delsert C., Saulnier D., Champomier-Verges M.C., Zagorec M., Munier-Lehmann H., Mazel D. et Le Roux F., "The metalloprotease Vsm is the main toxic factor for Vibrio splendidus extracellular products". Applied and Environmental Microbiology. V. 74, (2008), 7108-17.
169. Crosa J.H., (1997),, "Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria», Microbiology and Molecular Biology Reviews. V. 61, (1997), 319-336.
170. Yamamoto S., Okujo N., Yoshida T., Matsuura S. et Shinoda S., "Structure and iron transport activity of vibrioferrin, a new siderophore of Vibrio parahaemolyticus". The Journal of Biochemistry. V. 115, (1994), 868-874.
171. Griffiths G.L., Sigel S.P., Payne S.M. et Neilands J.B., "Vibriobactin, a siderophore from Vibrio Cholera". J Biol Chem. V. 259, (1984), 383-385.
172. Okujo N., Saito M., Yamamoto S., Yoshida T., Miyoshi S. et Shinoda S., "Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from Vibrio vulnificus". BioMetals. V. 7, (1994), 109-116.
173. Litwin C., Rayback T. et Skinner J., "Role of catechol siderophore synthesis in Vibrio vulnificus virulence". Infection and Immunity. V. 64, (1996), 2834-2838.
174. Crosa J.H., Schiewe M.H. et Falkow S., "Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen Vibrio anguillarum», Infection and Immunity. V. 18, (1977), 509-513.

175. Crosa J.H., "A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system". *Nature*. V. 284, (1980), 566-568.
176. Actis L.A., Fish W., Crosa J.H., Kellerman K., Ellenberger S.R., Hauser F.M. et Sanders-Loehr J., "Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1)". *Journal of Bacteriology*. V. 167, (1986), 57-65.
177. Stork M., Di Lorenzo M., Welch T.J., Crosa L.M. et Crosa J.H., "Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*", *Plasmid*. V. 48, (2002), 222-228.
178. Stork M., Di Lorenzo M., Mourino S., Osorio C.R., Lemos M.L. et Crosa J.H., "Two tonB systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence", *Infection and Immunity*. V. 72, (2004), 7326-7329.
179. López C. et Crosa J., "Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*", *BioMetals*. V. 20, (2007), 393-403.
180. Dorsey C.W., Tomaras A.P., Connerly P.L., Tolmasky M.E., Crosa J.H. et Actis L.A., "The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related", *Microbiology*. V. 150, (2004), 3657-3667.
181. Ménez A., Goyffon M. et Gillet D., "Les toxines: pour le pire et désormais le meilleur", *Biofutur*. V. 272, (2006), 22-42.
182. Reynaud Y., "Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénaïdes en Nouvelle-Calédonie". Thèse de Doctorat, Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie, Paris, (2008), 230.
183. Zhang X.H. et Austin B., "Haemolysins in *Vibrio* species". *Journal of Applied Microbiology*. V. 98, (2005), 1011-1019.

184. Shinoda S., "Protein toxins produced by pathogenic vibrios". *Journal of Natural Toxins*. V. 8, (1999), 259-269.
185. Ichinose, Y., Yamamoto, K., Nakasone, N., Tanabe, M. J., Takeda, T., Miwatani, T. & Iwanaga, M., "Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*", *Infect Immun*. 55, (1985), 1090-1093.
186. Gray, L. D. & Kreger, A. S., "Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*". *Infect Immun*. V. 48, (1985), 62–72.
187. T. Honda, T. I., "The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins". *Rev Med Microbiol*. V. 4, (1993), 106-113.
188. Zhong, Y., Zhang, X.-H., Chen, J., Chi, Z., Sun, B., Li, Y. & Austin, B., "Overexpression, Purification, Characterization, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Hemolysin VHH". *Infect Immun*. V. 74, (2006), 6001–6005.
189. Bai, F., Sun, B., Woo, N. Y. S. & Zhang, X.-H., "Vibrio harveyi hemolysin induces ultrastructural changes and apoptosis in flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells". *Biochem Biophys Res Commun*. V. 395, (2010), 70–75.
190. Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J. H. & Aoki, T., "Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout". *Microb Pathog*. V. 39, (2005), 109–119.
191. Yoh, M., Honda, T. & Miwatani, T., "Purification and partial characterization of a *Vibrio hollisae* hemolysin that relates to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*". *Can J Microbiol*. V. 32, (1986), 632–636.
192. Kothary, M.H., Delston, R.B., Curtis, S.K., McCardell, B.A., Tall, B.D., "Purification and Characterization of a *Vulnificolysin*-Like Cytolysin Produced by *Vibrio tubiashii*". *Appl. Environ. Microbiol*. V. 67, (2001), 3707–3711.

193. Winstanley C. et Hart C.A., "Type III secretion systems and pathogenicity islands», *Journal of Medical Microbiology*. V. 50, (2001), 116-126.
194. Mota L.J., Sorg I. et Cornelis G.R., "Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express», *FEMS Microbiology Letters*. V. 252, (2005), 1-10.
195. Tamano K., Aizawa S., Katayama E., Nonaka T., Imajoh-Ohmi S., Kuwae A., Nagai S. et Sasakawa C., "Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors», *Embo J*. V. 19, (2000), 3876-3887.
196. Daniell S.J., Takahashi N., Wilson R., Friedberg D., Rosenshine I., Booy F.P., Shaw R.K., Knutton S., Frankel G. et Aizawa S., "The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*», *Cellular Microbiology*. V. 3, (2001), 865-871.
197. Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C. et Abe A., "Supramolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure". *Proc Natl Acad Sci U S A*. V. 98, (2001), 11638-11643.
198. Henke J.M. et Bassler B.L., "Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*". *Journal of Bacteriology*. V. 186, (2004), 3794-3805.
199. Dziejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., Rahman M.H., Heidelberg J.F., Decker J., Li L., Montgomery K.T., Grills G., Kucherlapati R. et Mekalanos J.J., "Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system», *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 102, (2005), 3465-3470.
200. Park K.-S., Ono T., Rokuda M., Jang M.-H., Okada K., Iida T. et Honda T., "Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus*". *Infection and Immunity*. V. 72, (2004), 6659-6665.

201. Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., Heidelberg J.F. et Mekalanos J.J., "Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 103, (2006), 1528-1533.
202. Reidl J. et Klose K.E., "Vibrio cholerae and cholera: out of the water and into the host», *FEMS Microbiology Reviews*. V. 26, (2002), 125.
203. Caroff M. et Karibian D., "Structure of bacterial lipopolysaccharides», *Carbohydrate Research*. V. 338, (2003), 2431-2447.
204. Foster J.S., Apicella M.A. et McFall-Ngai M.J., "Vibrio fischeri lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* symbiotic light organ», *Developmental Biology*. V. 226, (2000), 242-254.
205. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A. et Reidl J., "Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation". *Infection and Immunity*. V. 69, (2001), 435-445.
206. Mathur J., Davis B.M. et Waldor M.K., "Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway". *Mol Microbiol*. V. 63, (2007), 848-858.
207. Medzhitov R., "Recognition of microorganisms and activation of the immune response". *Nature*. V. 449, (2007), 819-826.
208. Aladaileh S., Nair S.V. et Raftos D.A., "Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns», *Fish & Shellfish Immunology*. V. 23, (2007), 1196-1208.
209. Costa M., Prado-Alvarez M., Gestal C., Li H., Roch P., Novoa B. et Figueras A., "Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus*

- galloprovincialis) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria», *Fish & Shellfish Immunology*. V. 26, (2009), 515-523.
210. Green T.J. et Barnes A.C., "Inhibitor of REL/NF- κ B is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible". *Fish & Shellfish Immunology*. V. 27, (2009), 260-265.
211. Nyholm V.S., Stewart J.J., Ruby G.E. et McFall-Ngai J.M., "Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*". *Environmental Microbiology*. V. 11, (2009), 483-493.
212. Vance R.E., Isberg R.R. et Portnoy D.A., "Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System". *Cell Host & Microbe*. V. 6, (2009), 10-21.
213. Gravato-Nobre M.J. et Hodgkin J., "Caenorhabditis elegans as a model for innate immunity to Pathogens», *Cellular Microbiology*. V. 7, (2005), 741-751.
214. Tzou P., De Gregorio E. et Lemaitre B., "How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions". *Current Opinion in Microbiology*. V. 5, (2002), 102-110.
215. Vodovar N., Acosta C., Lemaitre B. et Boccard F., "Drosophila: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions», *Trends in Microbiology*. V. 12, (2004), 235-242.
216. Silva C.P., Waterfield N.R., Daborn P.J., Dean P., Chilver T., Au C., Sharma S., Potter U., Reynolds S. et French-Constant R., "Bacterial infection of a model insect: *Photobacterium luminescens* and *Manduca sexta*". *Cellular Microbiology*. V. 4, (2002), 329-339.

217. Nottage A.S. et Birkbeck T.H., "Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*", *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 56, (1990), 15-19.
218. Lane E. et Birkbeck T.H., "Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*". *Aquatic Living Resources*. V. 12, (1999), 343-350.
219. Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J.L. et Paillard C., "Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*". *Diseases of Aquatic Organisms*. V. 57, (2003), 109-116.
220. Allam B. et Ford S.E., "Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge", *Fish & Shellfish Immunology*. V. 20, (2006), 374-383.
221. Mateo D.R., Siah A., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R. et Greenwood S.J., (2009), "Differential in vivo response of soft-shell clam haemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence", *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 102, (2009), 50-56.
222. Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C. et Nicolas J.L., " Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*", *Developmental and Comparative Immunology*. V. 30, (2006), 367-79.
223. Miliotis M., Tall B. et Gray R., "Adherence to and invasion of tissue culture cells by *Vibrio hollisae*", *Infection and Immunity*. V. 63, (1995), 4959-4963.
224. Akeda Y., Nagayama K., Yamamoto K. et Honda T., "Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*". *Journal of Infectious Diseases*. V. 176, (1997), 822-824.
225. Moxon E.R. et Kroll J.S., "The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors", *Current Topics in Microbiology and Immunology*. V. 150, (1990), 65-85.

226. Wright A.C., Simpson L.M., Oliver J.D. et Morris J.G.J., "Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*", *Infection and Immunity*. V 58, (1990), 1769-1773.
227. Yoshida S., Ogawa M. et Mizuguchi Y., "Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*". *Infect Immun*. V. 47, (1985), 446-451.
228. Joseph L.A. et Wright A.C., "Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide Inhibits Biofilm Formation», *Journal of Bacteriology*. V. 186, (2004), 889-893.
229. Johnson J.A., Panigrahi P. et Morris J.G.J., "Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice". *Infection and Immunity*. V. 60, (1992), 864-869.
230. Waldor M., Colwell R. et Mekalanos J., "The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an Oantigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants". V. 91, (1994), 11388-11392.
231. Banin E., Vassilakos D., Orr E., Martinez R.J. et Rosenberg E., "Superoxide Dismutase Is a Virulence Factor Produced by the Coral Bleaching Pathogen *Vibrio shiloi*". *Current Microbiology*. V. 46, (2003), 418-422.
232. Bramble L. et Anderson R.S., "Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*". *Developmental & Comparative Immunology*. V. 21, (1997), 337-348.
233. Bramble L. et Anderson R.S., "A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*". *Developmental & Comparative Immunology*. V. 22, (1998), 55-61.

234. Lambert C., Soudant P., Choquet G. et Paillard C., "Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios», *Fish & Shellfish Immunology*. V. 15, (2003), 225-240.
235. Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C. et Nicolas J.L., "Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*". *Developmental and Comparative Immunology*. V. 30, (2006), 367-79.
236. Labreuche Y., (2006), "Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas*», Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, (2006), 277.
237. Igbinsosa E.O. et Okoh A.I., "Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries», *Research in Microbiology*. V. 159, (2008), 495-506.
238. Nelson, E. J., Chowdhury, A., Flynn, J., Schild, S., Bourassa, L., Shao, Y., LaRocque, R. C., Calderwood, S. B., Qadri, F. & Camilli, A., "Transmission of *Vibrio cholerae* is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment», *PLoS Pathog*. V 4, (2008), 1000187.
239. Bari, S. M. N., Roky, M. K., Mohiuddin, M., Kamruzzaman, M., Mekalanos, J. J. & Faruque, S. M., "Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples», *Proc Natl Acad Sci U S A*. V. 110, (2013), 9926–9931.
240. Natrah, F. M. I., Ruwandeepika, H. A. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P. & Defoirdt, T., "Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*" *Vet Microbiol*. V. 154, (2011), 124–129.
241. Hammer, B. K. & Bassler, B. L., "Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholera*". *Mol Microbiol*. V. 50, (2003), 101–104.

242. Zhu, J. & Mekalanos, J. J., "Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholera*", *Dev Cell*. V. 5, (2003), 647–656.
243. Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. & Verstraete, W., "Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture". *Aquaculture*. V. 240, (2004), 69–88.
244. Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. & Hamood, A. N., "Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*", *J Med Microbiol*. V. 53, (2004), 841–853.
245. Vandenberghe, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. & Swings, J., "Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems". *Aquaculture*. V. 219, (2003), 9–20.
246. Kim, M. S. & Jeong, H. D., "Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments», *Aquaculture*. V. 193, (2001), 99–211.
247. Saulnier, D., De Decker, S. & Haffner, P., "Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies". *J Microbiol Methods*. V. 77, (2009), 191–197.
248. Gharaibeh, D. N., Hasegawa, H. & Häse, C. C., "Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Vibrio tubiashii* targeting the metalloprotease gene», *J Microbiol Methods*. V. 76, (2009), 262–268.
249. Hossain, M. T., Kim, Y.-O. & Kong, I.-S., "Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes". *Mol Cell Probes*. V. 27, (2013), 171–175.
250. Brauns, L. A., Hudson, M. C. & Oliver, J. D., "Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells". *Appl Environ Microbiol*. V. 57, (1991), 2651–2655.

251. Lee, S. E., Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, H. S., Shin, J. H., Choi, S. H., Chung, S. S. & Rhee, J. H., "Direct Identification of *Vibrio vulnificus* in Clinical Specimens by Nested PCR», J Clin Microbiol. V. 36, (1998), 2887–2892.
252. Cohen, N. & Karib, H., "Vibrio spp. dans les produits de la pêche: Risques et prévention. (2007), 10.
253. Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. & Nishibuchi, M., "Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene". J Clin Microbiol. V. 37, (1999), 1173–1177.
254. Robert-Pillot, A., Guérolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.-M. & Quilici, M.L., "Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France". Int J Food Microbiol. V .91, (2004), 319–325.
255. Fields, P. I., Popovic, T., Wachsmuth, K. & Olsvik, O., "Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic". J Clin Microbiol.V. 30, (1992), 2118–2121.
256. Panicker, G., Call, D. R., Krug, M. J. & Bej, A. K., "Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays". Appl Environ Microbiol. V. 70, (2004), 7436–7444.
257. Paydar, M., Teh, C. S. J. & Thong, K. L., "Prevalence and characterisation of potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Malaysia using conventional methods, PCR and REP-PCR», Food Control. V. 32, (2013), 13–18.
258. Saulnier, D., De Decker, S. & Haffner, P., "Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies". J Microbiol Methods. V 77, (2009), 191–197.

259. Gubala, A. J. & Proll, D. F., “Molecular-Beacon Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Vibrio cholera*», *Appl Environ Microbiol.* V. 72, (2006), 6424–6428.
260. Gharaibeh, D. N., Biel, F. M. & Häse, C. C., “Development of monoclonal antibody-based assays for the detection of *Vibrio tubiashii* zinc-metalloprotease (VtpA)”, *J Microbiol Methods*, V. 94, n° 22, (2013), 125–132.
261. Marder et al., Marder EP, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J., Hurd S., Jervis R., Lathrop S., Muse A., Ryan P., Smith K., Tobin-D’Angelo M., “Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food—foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 2006–2017», *Morbidity and Mortality Weekly Report.* V. 67, (2018), 24–328. doi: 10.15585/mmwr.mm6711a3.
262. Dib Amira., “évaluation de la contamination des produits de la mer par les vibrio dans la region de l’Est Algerien”. mémoire de magistère.2007/2008.école nationale vétérinaire d’EL Harach, (2008),
263. Dib Amira., “Evaluation de la contamination microbienne des produits de la mer”. mémoire de Doctorat.2013/2014.école nationale vétérinaire d’EL Harach, (2014),
264. ISO 7218., “Microbiologie des aliments- Exigence générale et recommandations», (2007).
265. ISO/TS 21872-1 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*”. (2007).
266. 42. ISO/TS 21872-2 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*”. (2007).

267. Nogueroles, I. and Blanch, A.R., "Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous 392 keys», *J. App. Microbiol.* V. 105, (2008), 175-185.
268. Mattei, R., Vicario, C., Nardone, M. and Savarino, A., (2012) "Evaluation of the system 394 Axima/Saramis MALDI-TOF MS bioMérieux in a clinical laboratory», *Microbiologia Medica.* V. 395, n° 27, (2012), 34-37.
269. Dubois, D., Grare, M., Prere, M.F., Segonds, C., Marty, N. and Oswald, E., (2012) "Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology". *J. Clin. Microbiol.* V. 50, n°8, (2012), 2568-2576.
270. ISO 21872-1 "Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*". (2017).
271. Dalmaso, A., La Neve, F., Suffredini, E., Croci, L., Serracca, L., Bottero, M.T. and Civera, T., "Development of a PCR assay targeting the *rpoA* gene for the screening of *Vibrio* genus», *Food Anal. Methods.* V. 2, (2009), 317-324.
272. Chun, J., Huq, A. and Colwell, R.R., "Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions 407 of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*», *Appl. Environ. Microbiol.* V. 65, (1999), n°5, 2202-2208.
273. FIELDS I.P., POPOVIC T., WACHSMUTH K., OLSVIK O., "Use of polymerase Chain Reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains from the Latin American cholera epidemic". *J. Clin. Microbiol.* V. 30, (1992), 2118-2121.
274. Gaëtan PODEUR., "Quantification des bactéries histaminogènes et maîtrise de la formation d'histamine dans les produits marins par biopréservation", THÈSE DE DOCTORAT, Ecole doctorale N°495 Végétal, (2014), 19.

275. Fattal B., Doan A., Tchorsh Y., "Rates of experimental microbiological contamination of fish exposed to polluted water", *Water Research*, V. 26, (1992), n° 12, 1621–1627.
276. Organisation mondiale de la santé (OMS), Chapitre 3 Évaluation du risque sanitaire. "l'utilisation sans risque des eaux usées, des excréta et des eaux ménagères ». V 3, (2013), 39.
277. Maha A., El-Hady, Nahla R., El-khatib and Essam S., Abdel-Aziz. Microbiological., "studies on *Vibrio* species isolated from some cultured fishes", *Animal Health Research Journal*, V. 3, (2013), n° 1, 12-19.
278. Mohamed Ibrahim, M.A., Sami Shabeeb Al Shabeeb., Noureldin, E.A. and Ghamri H. Al Ramadhan., "Occurrence of Potentially Pathogenic *Vibrio* and related species in Seafoods obtained from the Eastern Province of Saudi Arabia", *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, V. 3, (2016), n° 12, 71-80.
279. Adebayo-Tayo B.C., Okonko I.O., John M.O., Odu N.N., Nwanze J.C et Ezediokpu M.N., "Occurrence of Potentially Pathogenic *Vibrio* Species in Sea Foods Obtained from Oron Creek". *Biological Research*, V. 5, (2011), n°6, 356-365.
280. Moustafa M., Eissa A.E., AM Laila A., Gaafar A.Y., Abumourad I.M.K., and MY Elgendy., "Investigations into the Potential Causes of Mass Kills in Mari-Cultured Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) at Northern Egypt", *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, V. 6, (2015), n° 1, 466.
281. Morsi G., Sellami H., Nasfi H., Trabelsi R., Mansour S., Attia T., Siwar N., Tatiana V., Gdoura R, and Siala M., " Molecular Detection of the Three Major Pathogenic *Vibrio* Species from Seafood Products and Sediments in Tunisia Using Real-Time PCR ", *Journal of Food Protection*, V. 79, (2016), n° 12, 2086–2094.

282. Mohammed A.b., Alaa Eldin E., Magdy H., Okada M.A., "Identifying some pathogenic *Vibrio*/*Photobacterium* species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces", science direct ,international journal of veterinary science and medicine, V. 1, (2013), n° 2, 87-95.
283. Ravikumar, V. and Vijayakumar., " Prevalence, distribution and phenotypic identification of vibrio sp. in fishes caught off chennai, indian ocean ", international journal of current research, V. 9, (2017), n° 6, 51698-51705.
284. E. A. Noureldin., Mohamed A., Hassen and Ghamri., Al Ramadhan., "IGS-Fingerprinting and Virulence Properties of *Vibrio alginolyticus* Isolated from Farmed Fishes in Saudi Coast of Arabian Gulf", Journal of Fisheries and Aquatic Science, V. 13, (2018), n° 2, 56-65.
285. Okonko, I.O., Adebayo-Tayo, B.C., John, M.O., Odu, N.N., Nwanze, J.C., Ezediokpa, M.N., 2011. "Occurrence of Potentially pathogenic *Vibrio* species in seafoods obtained from Oron creek". Advances in Biological Research. V, 5, (2011), n° 6, 356-365.
286. Sabir M., Ennaji Moulay M et Cohen N., "Vibrio Alginolyticus: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases". International Journal of Science and Technology. V, 2, (2013), n°4, 302-309.
287. Zorrilla M.A., Chabrillon A.S., Rosales P.D., Manzanares E.M., Balebona M.C., Morinigo M.A., "Bacteria recovered from diseased cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) in southwestern Spain Aquaculture",V. 218, (2003), n° 1-4, 11–20.
288. Ben Kahla-Nakbi A., Lachkar-Kacem H., Elmnasse N., Cheriaa J., Bakhrouf A., "Aspects histopathologiques associés à l'infection du loup et de la daurade par *Vibrio alginolyticus*", Mar. Life, V.16, (2006), n° 1-2, 31-36 : Reçu en décembre 2004 , accepté en février 2007.

289. Farama, E., Lesne, J., Touron, A., Wallet, F., “Shellfish and non-cholera 526 vibrios in coastal waters: Characterization of human exposure. Environ. 527”, *Risques Sante*, V. 7, (2008), 191-201.
290. Xing M., Hou Z., Yuan J., Liu Y., Qu Y., Liu B. “Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*)”, *FEMS Microbiol. Ecol*, V. 86, (2013), n° 3, 432-43.
291. Sujatha .k., Senthilkumaar P., Sangeetha S., Gopalakrishnan M.D., “Isolation of human pathogenic bacteria in two edible fishes, *Priacanthus hamrur* and *Megalaspis cordyla* at Royapuram waters of Chennai, India”, *Indian Journal of Science and Technology*, V. 4, n° 5, 539-541.
292. Thi A. N. T., Jacxsens L., Nosedo B., Samapundo S., Nguyen B. L., Heyndrickx M., et al. “Evaluation of the microbiological safety and quality of Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* during processing by a microbial assessment scheme in combination with a self-assessment questionnaire”. *Fish. Sci*, V. 80, (2014), n° 4, 1117–1128.
293. Naïma B M et Said H., “Étude de la prévalence des Vibrions Spp dans les produits de la pêche au Maroc”, *Afrique SCIENCE* ,V. 10, (2014), n° 2, 365 – 372.
294. Anonyme 10., “Rapport du Comité du Codex sur les poissons et les produits de la pêche”, Produit par Département de l'agriculture, archive, FAO: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7603f/x7603f0s.htm>.(11/10/2014).
295. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), “Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 States, 2009”. *MMWRMorb Mortal Wkly Rep*, V. 59, (2010), 418-22.

296. Dechet AM., Yu PA., Koram N., Painter J., "Nonfoodborne *Vibrio* Infections: An Important Cause of Morbidity and Mortality in the United States, 1997-2006". *Clin Infect Dis*, V. 46, (2008), 970-6.
297. Ottaviani D., Leoni F., Rocchegiani E., Santarelli S., Masini L., DiTrani V, et al., "Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy". *Int J Food Microbiol*, V. 132, (2009), 47-53.
298. Lee, J.V., Shread, P., Furniss, A.L., "The taxonomy of group F organisms: relationships to *Vibrio* and *Aeromonas*". *J. Appl. Microbiol*, V. 45, (1978).
299. Lee, J.V., Shread, P., Furniss, A.L., Bryant, T.N., "Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp nov (Synonym Group F vibrios, Group EF-6)", *J. Appl. Bacteriol*, V. 5, (1981), 73-94.
300. Morris, J.G., Jr., Black, R.E., "Cholera and other vibrios in the United States". *N. Engl. J. Med*, V. 312, (1985), 343-350.
301. McNicol, L.A., Kaper, J.B., Lockman, H.A., Remmers, E.F., Spira, W.M., Voll, M.J., Colwell. R.R., "R-factor carriage in a group F *Vibrio* isolated from Bangladesh". *Antimicrob. Agents Chemother*, V. 17, (1980), 512-515.
302. Hodge, T.W., Jr., Levy, C.S., Smith, M.A., "Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* infection in a patient with AIDS". *Clin. Infect. Dis*, V. 21,1(1995), 237-238.
303. Igbinosa, E.O., Obi, C.L., Okoh, A.I., "Occurrence of potentially pathogenic vibrios in the final effluents of a wastewater treatment facility in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa". *Res. Microbiol*, V. 160, (2009), 531-537.
304. Kobayashi, K., Ohnaka, T., "Food poisoning due to newly recognized pathogens". *Asian Med. J*, V. 312, (1989), 1-12.

305. Levine, W.C., Griffin, P.M., "Vibrio infections on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance". Gulf Coast Vibrio Working Group. *J. Infect. Dis.*, V. 167, (1993), 479-483.
306. Yoshii, Y., Nishino, H., Satake, K., Umeyama, K., "Isolation of *Vibrio fluvialis*, an unusual pathogen in acute suppurative cholangitis", *Am. J. Gastroenterol.*, V. 82, (1987), 903-905.
307. Albert, M.J., Hossain, M.A., Alam, K., Kabir, I., Neogi, P.K.B., Tzipori, S., "A fatal case associated with shigellosis and *Vibrio fluvialis* bacteremia". *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, V. 14, (1991), 509-510.
308. Lee, J.V., Donovan, T.J., Furniss, A.L., "Characterization, taxonomy, and amended description of *Vibrio Metschnikovii*". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, V. 28, (1978), 99-111.
309. Nasreldin Elhadi, Son Radu, Chien-Hsien Chen, Mitsuaki Nishibuchi., "Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia", *J Food Pro.*, V. 67, n° 7, (2004), 1469-75.
310. Yalcinkaya, F., Ergin, C., Agalar, C., Kaya, S., and Aksoylar, M. Y. "The presence and antimicrobial susceptibilities of human-pathogen *Vibrio* spp. isolated from blue crab (*Callinectes sapidus*) in Belek tourism coast, Turkey". *Int. J. Environ. Health Res.* V.13, (2003), 95–98.
311. Yücel, N., and Balci, S., "Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey". *J. Food Prot.*, V. 73, (2010), 380–384.
312. Huq Ml., Alam AK., Brenner DJ., Morris GK., "Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea". *J Clin Microbiol.*, V. 11, (1980), n° 6, 621-624.

313. Levine WC., Griffin PM., "Vibrio infections on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance". Gulf Coast Vibrio Working Group. The Journal of infectious diseases, V. 167, (1993), n°2, 479-483.
314. Evans MC., Griffin PM., Tauxe RV., "CDC report: Vibrio surveillance system, summary data, 1997-2000". Available from: URL: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/CSTE_Vibrio_2000.pdf.
315. Chowdhury G., Pazhani GP., Dutta D., Guin S., Dutta S., Ghosh S., Izumiya H., Asakura M., Yamasaki S., Takeda Y., Arakawa E., Watanabe H., Mukhopadhyay AK., Bhattacharya MK., Rajendran K., Nair GB., Ramamurthy T., "Vibrio fluvialis in Patients with Diarrhea, Kolkata, India". Emerg Infect Dis, V. 18, (2012), n°11, 1868-1871. 10.3201/eid1811.120520.
316. Bhattacharjee S., Bhattacharjee S., Bal B., Pal R., Niyogi SK., Sarkar K., "Is Vibrio fluvialis emerging as a pathogen with epidemic potential in coastal region of eastern India following cyclone Aila". J Health Popul Nutr, V. 28, (2010), n° 4, 311-317.
317. Seidler RJ., Allen DA., Colwell RR., Joseph SW., Daily OP., "Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States". Appl Environ Microbiol, V. 40, (1980), n° 4, 715-720.
318. 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), 228-264.
319. Thompson, F. L., B. Hoste, K., Vandemeulebroecke, and J. Swings., 2003. "Reclassification of Vibrio hollisae as Grimontia hollisae gen". nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, V. 53, 1615-1617.
320. Anwar E., Al-Sunaiher., Abdelnasser S.S., Ibrahim and Ali A. Al-Salamah., " Association of Vibrio Species with Disease Incidence in Some Cultured Fishes in the Kingdom of Saudi Arabia", © IDOSI Publications, (2010), World Applied Sciences Journal, V. 8, n° 5, 653-660, ISSN 1818-4952.

321. Hineostrova F, Madeira RG and Bourbeau PP (2007)., " Severe Gastroenteritis and Hypovolemic Shock Caused by Grimontia (Vibrio) hollisae Infection", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Vol. 45, (2007), No. 10, 3462–3463.
322. Laurence Miossec., "Les vibrions pathogènes pour l'homme : le risque associé au milieu marin en France", Ifremer, (2002), 21-22.
323. Gras-Rouzet S., Donnio PY., Juguet F., Plessis P., Minet J., Avril JL., " First European case of gastroenteritis and bacteremia due to Vibrio hollisae", Eur J Clin Microbiol Infect Dis, V. 15, (1996), 864–866. Doi: 10.1007/BF01691217.
324. Edouard S., Daumas A., Branger S., Durand JM., Raoult D and Fournier PE., "Grimontia hollisae, a potential agent of gastroenteritis and bacteraemia in the Mediterranean area". European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, V. 28, n° 6, (2009), 705-7.
325. M. L. Avsever, M. Öz., " First isolation of tdh positive Grimontia hollisae from oysters in Turkey", Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., V. 36, (2016), n° 5, 186 – 192.
326. Bachère, E., E. Mialhe, D., Noël, V., Boul, A., Morvan and J., Rodrigues., "Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology", Aquaculture, V.132, n° 1-2, (1995), 17-32.
327. Verschuere, L., G. Rombaut, P., Sorgeloos and W. Verstraete., "Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture". Microbiol. Mol. Biol. Rev, V. 64, n° 4, (2000), 655-671.
328. Schulze, A.D., A.O. Alabi, A.R., Sheldrake and K.M Miller., "Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains", Aquaculture, V. 256, n° 1-4, (2006), 50-73.
329. Hansen, G.H., and J.A Olafsen., "Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish". Microbial Ecol, V.38, n° 1, (1999), 1-26.

330. Sandaa, R.A., T. Magnesen, L., Torkildsen and O. Bergh., "Characterization of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)", *Syst. Appl. Microbiol*, V. 26, n° 2, (2003), 302-311.
331. Lowry PW., McFarland LM., Threefoot HK ., "Vibro hollisae septicemia after consumption of catfish", *J Infect*, V.154, n° 4, (1986), 730–1.
332. Vezzulli L., Pezzati E., Moreno M., Fabiano M., Pane L., Pruzzo C., et al., "Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy)", *Microb Ecol*, V. 58, (2009), 808-18.
333. Amel Ben Kahla-Nakbi., Hédia Lachkar-Kacem., Noura Elmnasse., Jihène Cheriaa., Amina Bakhrouf ., "Aspects histopathologiques associés à l'infection du loup et de la daurade par *Vibrio alginolyticus*", *Mar. Life*, V.16, n° 1-2, (2006) ,31-36 : Reçu en décembre 2004 , accepté en février 2007.
334. Thompson J.R., M.A. Randa, L.A., Marcelino, A., Tomita-Mitchell, E. Lim., M.F. Polz., "Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community". *Appl. environ. Microbiol*, V. 70,n° 7, (2004), 4103- 4110.
335. Lhafi S.K., M. Kühne., "Occurrence of *Vibrio* sp in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea". *Food Microbiol*, V. 116, n° 2, (2007), 297-300.
336. Mahmud ZH., Neogi SB., Kassu A., Mai Huong BT., Jahid IK., Islam MS., et al., "Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan". *FEMS Microbiol Ecol*, V. 64, (2008), 209-18.
337. Wu B., Liang W., M. Yan, J., Li, H. Zhao., L. Cui., F. Zhu., J. Zhu, B. Kan., "Quorum sensing regulation confronts the development of a viable but non-culturable state in *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology*", (2020), <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15026>

- Gomez-Gil, J., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Garcia-Gasca, A., Roque, A. and Swings, J., (2004) "Vibrio hispanicus sp. nov., isolated from Artemia sp. and seawater in Spain". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, V.54, n° 1, (2004), 261-265.
338. Dib, A., "Evaluation de la contamination des produits de la mer par les vibrio dans la region de l'Est Algerien". Mémoire de magistère, 2007/2008, Ecole nationale vétérinaire d'EL Harach, (2008).
339. Lundebye, A.K., Locka, E.J., Rasingera, J.D., Nøstbakkena, O.J., Hannisdala, R., Karlsbakkb, E., Wennevikb, V., Madhumb, A.S., Madsena, L., Graffa, I.E., Ørnsruda R., "Lower levels of Persistent Organic Pollutants, metals and the marine omega 3-fatty acid DHA in farmed compared to wild Atlantic salmon (*Salmo salar*)", *Environmental Research*, V. 155, (2017), 49–59.
340. Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A., Schwager, S.J., "Global assessment of organic contaminants in farmed salmon". *Science*, V. 303, n° 5655, (2004), 226–229.
341. Valentin A., Tremblay T., Gagnon F. et Cartier J.F., "Régie régionale de la santé et des services sociaux de la Côte-Nord", Direction de la santé publique, (2000) 90.
342. Oliveira J., Cunha A., Castilho F., Romalde J.L., Pereira M.J., A mini-review. *Food Control*, V. 22, n° 2011, 805-816.
343. K. Park, J.S. Mok, J.Y. Kwon, A.R. Ryu, S.H. Kim, H.J. Lee, 2018. Food-borne outbreaks, distributions, virulence, and antibiotic resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in Korea from 2003 to 2016: a review. *Fish. Aquatic. Sci.* 21(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s41240-018-0081-4>
344. Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., & Martinez-Urtaza, J., "Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio* 400 *parahaemolyticus*: a European perspective". *Environmental Microbiology 401 Reports*, V. 2, n° 1, (2010), 7-18.

345. Baker-Austin, C., Trinanés, J. A., Taylor, N. G. H., Hartnell, R., Siitonen, A., & 403 Martínez-Urtaza, J., “Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to 404 ocean warming”. *Nature Climate Change*, V. 3, n° 1, (2012), 73-77.
346. Tall, A., Teillon, A., Boisset, C., Delesmont, R., Tournon-Bodilis, A., & Hervio-Heath, 538 D., “Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp”. 539 strains. *Journal of applied microbiology*, V.113, n° 2, (2012), 361-372.
347. Robert-Pillot, A., S. Copin, C., Himber, M., Gay, and M. L. Quilici., “Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR”. *Int. J. Food Microbiol*, V. 189, (2014), 75–81.
348. Franco Monsreal, J., L. E. Serralta-Peralta, J. R., Hernandez Gomez, F., Sosa-Castilla, and J. A., Castillo-Cocom., “Prevalence of clinically important species of the genus *Vibrio* in catered seafood of city and port of Progreso de Castro, Yucatan, Mexico”. *Medwave*, V. 15, (2015), 6147.
349. Thi Thu Tra Vu , Thomas Alter , Stephan Huehn., “Prevalence of *Vibrio* spp. in Retail Seafood in Berlin, Germany “, *J Food Prot*, V. 81, n° 4, (2018), 593-597.
350. Collin B., Rehnstam-Holm A.S., “Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden”. *FEMS Microbiol. Ecol*, V. 78, n° 2, (2011), 306-313.
351. DePaola A., Jones J.L., Woods J., Burkhardt W., Calci K.R., Krantz J.A., Bowers J.C., Kasturi K., Byars R.H., Jacobs E., Williams-Hill D., Nabe K, “Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey”. *Appl. Environ. Microbiol*, V. 76, n° 9, (2010), 2754–2768.
352. Malainine S.M., Mimouni R., Scheftel J.M., Bensmail L. (2013), “Prevalence des espèces du genre *Vibrio*, dans l’eau, les coquillages et les sédiments de la lagune de Khnifiss (sud du Maroc)”, *REMISE*, V. 7, n° 1, (2013), 49-61.

353. 34. Woodring, J., A. Srijan, P., Puripunyakom, W., Oransathid, B., Wongstitwilairoong, and C. Mason., "Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Vibrio*, *Salmonella*, and *Aeromonas* isolates from various uncooked seafoods in Thailand". *J. Food Prot*, V. 75, (2012), 41–47.
354. S. Baron, E., Larvor, S., Chevalier, E., Jouy, I., Kempf, S.A., Granier, J., Lesne, 2017. "Antimicrobial susceptibility among urban wastewater and wild shellfish isolates of non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance Estuary (Brittany, France)", *Front. Microbiol*, V. 8, 1637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01637>
355. I. Cañigral, Y., Moreno, J.L., Alonso, A., González, M.A., Ferrús., "Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiol*". *Res*, V. 165, (2010), 657-664. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.012>
356. L. Masini, G., De Grandis, F., Principi, C., Mengarelli, D., Ottaviani., "Research and characterization of pathogenic vitrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy)", *Water Res*, V.41, (2007), 4031-4040. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.003>.
357. A.I. Okoh, E.O., Igbinosa, 2010. "Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa". *BMC Microbiol*, V.10, n°1, (2010), 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-143>.
358. G. Ziino, G., Donato, F., Giarratana, A., Giuffrida, A., Panebianco, Bacteriological "analysis to *Arca noae* (Linnaeus, 1758) in the South of Italy: The first record of halophilic *Vibrio*". *Cah. Biol. Mar*, V. 55, (2014), 389-397.
359. Awasthi S. P., Chowdhury N., Neogi S. B., Hinenoya A., Hatanaka N., Chowdhury G., et al., "Development of a multiplex PCR assay for the detection of major virulence genes in *Vibrio cholerae* including non-O1 and non-O139 serogroups". *J. Microbiol. Meth*, V. 157, (2019), 54–58. [10.1016/j.mimet.2018.12.012](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.012).
360. Anisia J Silva , Jorge A Benitez ., "Vibrio cholerae Biofilms and Cholera Pathogenesis", *PLoS Negl Trop Dis*, V. 4, n° 10, (2016), e0004330.

361. Ashrafus Safa., Jinath Sultana Jime., Farishta Shahel., “Cholera toxin phage: structural and functional diversity between *Vibrio cholerae* biotypes“, *AIMS Microbiology*, V. 6, n° 2, (2020), 144-151.
362. Chien-Hsien Chen , Toshio Shimada, Nasreldin Elhadi, Son Radu, Mitsuaki Nishibuchi., “Phenotypic and genotypic characteristics and epidemiological significance of ctx+ strains of *Vibrio cholerae* isolated from seafood in Malaysia”, *Appl Environ Microbiol*, V. 70, n° 4, (2004), 1964-72.
363. Snoussi M., Noumi E., Messaoud A., Hajlaoui H., Bakhrouf A., “Biochemical characteristics and genetic diversity of *Vibrio* spp. and *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the Lac of Bizerte (Tunisia), World”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, (2010), DOI: 10.1007/s11274-0100388-5.
364. Snoussi M., Noumi E., Usai D., Sechi LA., Zanetti S., Bakhrouf A., “Distribution of some virulence related-properties of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Mediterranean seawater (Bay of Khenis, Tunisia): investigation of eight *Vibrio cholerae* virulence genes. World”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, V. 24, (2008), 2133-2141.
365. Chowdhury, G., Pazhani, G.P., Dutta, D., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., et al., “*Vibrio fluvialis* in patients with diarrhea, Kolkata, India”. *Emerg. Infect. Dis.*, V. 18, n° 11, (2012), 1868–1871. doi:10.3201/eid1811.120520.
366. Liang, P., Cui, X., Du, X., Kan, B., and Liang, W., “The virulence phenotypes and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio fluvialis* in China”, *Gut Pathog*, V. 5, (2013), 6. doi:10.1186/1757-4749-5-6
367. Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Fanelli, I., and Grasso, G.M., “Detection of *Salmonella*, *Listeria* spp., *Vibrio* spp., and *Yersinia enterocolitica* in frozen seafood and comparison with enumeration for faecal indicators: implication for public health”. *Ann. Ig*, V. 16, (2004), 531–539.
368. Igbinosa, E.O., Obi, L.C., and Okoh, A.I., “Occurrence of potentially pathogenic vibrios in final effluents of a waste water treatment facility in a rural community of the

- Eastern Cape Province of South Africa". *Res. Microbiol*, V. 160, (2009), 531–537.
doi:10.1016/j.resmic.2009.08.007
369. Oliver, J.D., Kaper, J.B., "Vibrio Species". In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, and ed., Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, (2001), 263-300.
370. 28. Kothary, M.H., Lowman, H., McCardell, B.A., Tall, B.D., "Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*". *Infect. Immun*, V. 71, (2003), 3213-3220.
371. Schirmeister F., Dieckmann R., Bechlars S., Bier N., Faruque SM., Strauch E., "Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, V. 33, n° 5, (2014), 767–78.21.
372. Kelly MT., "Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Vibrio) vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment". *Appl Environ Microb*, V. 44, (1982), 820–824.
373. Motes ML, DePaola A., Cook DW et al., "Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*)", *Appl Environ Microb*, V 64? (1998), 1459–1465.
374. Gonzalez-Acosta B., Bashan Y., Hernandez-Saavedra NY., Ascencio F & Cruz-Agüero Gdl., "Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region". *Microbiol Ecol*, V. 55, (2006), 311–321.
375. Oliver JD., "The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43: 93–100. Phillips K E, Satchell K J F. 2017. *Vibrio vulnificus*: From oyster colonist to human pathogen". *PLoS Pathog*, V.13, (2005), 1006053.

376. Bauer A., Ostensvik O., Florvag M., Ormen O & Rorvik LM., "Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*)", *Appl Environ Microb*, V. 72, (2006), 3058–3061.
377. DePaola A., Nordstrom JL., Bowers JC., Wells JG & Cook DW., "Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters". *Appl Environ Microb*, V. 69, (2003), 1521–1526.
378. Collin Betty ., Ann-Sofi Rehnstam-Holm., "Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden", *FEMS Microbiol Ecol*, V. 78, n° 2, (2011), 306-13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01157.x.
379. C. Baker-Austin, J., Trinanes, N., Gonzalez-Escalona, J., Martinez-Urtaza., "Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change". *Trends Microbiol*, V. 25, (2017), 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.008>.
380. C.W. Tan, Y., Rukayadi, H., Hasan, T.Y., Thung, E., Lee, W.D., Rollon, H., Hara, A.Y., Kayali, M., Nishibuchi, S., Radu, "Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. Saudi", *J. Biol. Sci.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.002>.
381. X. Zhao, J., Zhong, C., Wei, C.W., Lin, T., Ding., 2017. "Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens". *Front. Microbiol*, V. 8, (2017), 580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>.
382. Casadevall, A. & Pirofski, L.A., (2009), "Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework". *J Water Health*. V. 7, n° 1, (2009), 2–18.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ABC	: ATP Binding Cassette
acf	: Accessory colonisation factor
<i>ADH</i>	: <i>Arginine dihydrolase</i>
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomal
BET	: Bromure d'Éthidium
cep	: Core-encoded pili
CPS	: Capsule polysaccharidique
CT	: Cholera Toxin
CVEC	: Conditionally Viable Environmental Cells
Da	: Dalton
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
FISH	: Hybridation fluorescente in situ
HGT	: Transferts horizontaux de gènes
Hz	: hertz
ID	: Identification
ISO	: Organisation Internationale normalisation
Kb	: kilobase
kV	: Kilovolt
l'AFLP	: polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
LBP	: LPS binding protein
LDC	: lysine decarboxylase
LPS	: Lipopolysaccharides
Maldi-Tof	: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
µg	: Microgramme
MgCl ₂	: Chlorure de magnésium
µL	: Microlitre
MLEE	: Electrophorèse enzymatique multilocus
MLST	: Multilocus sequence typing

μm	: Micromètre
mM	: Millimole
MSHA	: Mannose-sensitive hemagglutinin
NaCl	: Chlorure de sodium
<i>NAG</i>	: Non Agglutinating Vibrio
NCV	: Non Cholera Vibrio
NF- κ B	: Nuclear factor κ B
ns	: Nanosecond
OMP	: Outer Membrane Protein
<i>ompU</i>	: Outer membrane protein
OMS	: Organisation mondiale de la santé
pb	: Paire de bases
PCR	: Réaction de Polymérisation en Chaîne
pH	: potentiel hydrogène
pmol	: Picomole
qPCR	: PCR en temps réel
QS	: Quorum sensing
RFLP	: Polymorphisme de taille des fragments de restriction
ROS	: Espèces oxygénées réactives
SARAMIS	: Spectral ARchive And Microbial Identification System
SSTT	: Le système de sécrétion de type III
TCBS	: Thiosulfate itrate bile saccharose
TCP	: Toxin-Coregulated Pilus
<i>TDH</i> et	: Thermostable Direct Hemolysin
<i>TRH</i>	: TDH-Related Hemolysin
UFC	: Unité formant colonie
UV	: Ultra-violet
V	: Vibrio
VBNC	: Etat viable non cultivable
VBNC	: Etat viable non cultivable (Viable But Non-Culturable)
VP	: Voges Proskauer
%	: Pourcent

APPENDICE B

MATERIEL DE LABORATOIRE

1. Appareillage et verrerie :

- Balance de précision 0,01 g ;
- Stomacher;
- Spectrophotomètre ;
- MALDI-TOF ms ;
- Centrifugeuse ;
- PCR ;
- Electrophorèse ;
- Agitateur ;
- Boîte d'éclairage UV
- Incubateurs (37°C, 42°C) ;
- Consommables (anse jetables 10µl, anse de platine, boites de pétri, Sac stomacher pipettes Pasteur) ;
- Tubes à essai ;
- Verre à pied (200cc, 60cc).

2. Milieux et réactifs

- Eau Peptonée Alcaline à 2% NaCl ;
- pH mètre ;
- Gélose TCBS ;
- Réactif KOVACS ;
- Galeries biochimiques API20E ;
- Sérums agglutinants pour l'O1 (BTA 491) et O139 (BTA 494) ;
- Tampon Tris-borate-EDTA (TBE).
- Gel agarose (agarose, TBE, solution de bromure d'ethidium) ;
- Buffer Taq polymérase ;
- MgCl₂ ;
- dNTPs ;
- Amorces (rpoA ,prVC, ctxA).

