

Prévalence de *Vibrio parahaemolyticus* dans les mollusques bivalves purifiés en Tunisie : application aux réseaux de collecte des palourdes (*Ruditapes decussatus*)

Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in purified bivalve molluscs in Tunisia: application to health surveillance systems for harvesting clams (*Ruditapes decussatus*)

Samia Zrelli*¹, Walid Oueslati¹, Leila Essalah², Michel Federighi³, Asma Ghariani²,
Monia El Bour⁴, Mohamed Chabouni⁵, Leila Slim-Saidi², Abdelfettah Ettriqui¹

1. Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Univ. de la Manouba, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire 2020 Sidi Thabet, Tunisie.
 2. Unité de recherche UR 12SP 18 - Laboratoire de Microbiologie hôpital A.MAMA, Pneumologie Ariana, Tunisie.
 3. Département ALIM-SCAN, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique (ONIRIS), France.
 4. Laboratoire de Pathologie des Organismes Aquatiques, Institut National des Sciences et Technologie de la Mer, Salammbô, Tunisie
 5. Direction Générale des Services Vétérinaires, Tunisie
- * Corresponding author: Samia Zrelli: samiazrelli@yahoo.fr

Abstract

Zrelli S., W. Oueslati, L. Essalah, M. Federighi, A. Ghariani, M. El Bour, M. Chabouni, L. Slim-Saidi, A. Ettriqui, – [Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in purified bivalve molluscs in Tunisia: application to health surveillance systems for harvesting clams (*Ruditapes decussatus*)]. *Mar. Life*, 18: 25-31.

Vibrio parahaemolyticus (*V. parahaemolyticus*) is recognized as pathogenic and infections are generally acquired through consumption of contaminated seafood. Strains producing hemolysin are potentially pathogenic. In Tunisia, almost all of the production of live bivalve molluscs consists of clams (*Ruditapes decussatus*). Clam harvesting has been a leading sector for many years, with the recognition of Tunisia as exporter to the European Union. The aim of this work was to study the prevalence of *V. parahaemolyticus* in purified clams collected from markets in Tunisia during the fishing season, and secondly to search for the genes of the hemolysin *tdh* and *trh*. 70 samples of purified clams collected randomly from markets were analyzed during the harvesting season (October to May 2012). The research was performed according to the standard method ISO / TS 21872-1:2007. A PCR protocol was adopted for confirmation of *V. parahaemolyticus* and for the detection of virulence genes (*tdh* and *trh*). The results showed a very low prevalence (1.4% or 1/70). The strain of *V. parahaemolyticus* isolated was a carrier of the virulence gene *trh*, and is thus potentially pathogenic.

KEY-WORDS :

Clams, *Vibrio parahaemolyticus*, Hemolysin.

Résumé

Zrelli S., W. Oueslati, L. Essalah, M. Federighi, A. Ghariani, M. El Bour, M. Chabouni, L. Slim-Saidi, A. Ettriqui, – Prévalence de *Vibrio parahaemolyticus* dans les mollusques bivalves purifiés en Tunisie : application aux réseaux de collecte des palourdes (*Ruditapes decussatus*). *Mar. Life*, 18 : 25-31.

Vibrio parahaemolyticus (*V. parahaemolyticus*), fait partie des vibriens reconnus comme pathogènes par voie alimentaire et véhiculés par les produits de la mer. Les souches produisant des hémolysines (*Thermostable Direct Hemolysin* ou *tdh* et *tdh-Related Hemolysin* ou *trh*) sont potentiellement pathogènes. En Tunisie, la quasi-totalité de la production des Mollusques Bivalves Vivants (MBV) est constituée par la palourde (*Ruditapes decussatus*). Cette filière est un secteur de pointe depuis de nombreuses années, avec la reconnaissance de la Tunisie comme pays exportateur vers l'Union Européenne. L'objectif de ce travail, est d'étudier la prévalence des *V. parahaemolyticus* dans les palourdes purifiées et mises sur le marché en Tunisie pendant la campagne de pêche, et de rechercher les gènes des hémolysines *tdh* et *trh*. 70 échantillons de palourdes purifiées ont été prélevés dans différents points de vente pendant la campagne de pêche s'étalant du 1^{er} octobre 2012 au 15 mai 2013. La recherche de *V. parahaemolyticus* a été effectuée selon la méthode normalisée ISO/TS 21872-1:2007. Un protocole PCR a été adopté pour la confirmation de l'espèce et pour la détection des gènes de virulence. Les résultats, ont montré une prévalence très faible (1,4% soit 1/70). Par ailleurs, la souche de *V. parahaemolyticus*, isolée s'est révélée porteuse du gène de virulence *trh*, et donc potentiellement pathogène.

MOTS CLÉS :

Palourdes, *Vibrio parahaemolyticus*, Hémolysines.

Introduction

L'espèce *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*), est une bactérie spécifique du milieu marin et estuarien du monde entier ; elle est isolée dans les eaux dont la température est supérieure à 10 °C. Les vibriions, sont présents dans tous les produits de la mer et se concentrent dans les coquillages durant le processus de filtration naturel. La chair, ainsi que le liquide intervalvaire sont aussi représentatifs du niveau de contamination du coquillage (Robert-Pillot *et al.*, 2002).

Le rôle de *V. parahaemolyticus* dans les Maladies Infectieuses d'Origine Alimentaire (MIOA), est connu depuis les années 50. Il est admis que la capacité de *V. parahaemolyticus* à produire une hémolyse sur gélose au sang, est directement reliée à son pouvoir pathogène chez l'homme (phénomène de KANAGAWA) (Lesne, Fournier, 2005). Ce micro-organisme est capable de produire plusieurs facteurs hémolytiques parmi lesquels deux hémolysines sont classées comme facteurs de virulence avérés. Il s'agit de *tdh* (*thermostable direct hemolysin*, une hémolysine thermostable directe) et de *trh* (*tdh-related hemolysin*, une hémolysine apparentée à l'hémolysine thermostable directe). De fait, les souches de *V. parahaemolyticus* *tdh+* et/ou *trh+* seront celles les plus fréquemment impliquées lors de MIOA. La consommation de coquillages ou de poissons crus ou insuffisamment cuits, est le principal facteur de risque connu pour ces MIOA.

En Tunisie, la quasi-totalité de la production des Mollusques Bivalves Vivants (MBV) est constituée par la palourde (*Ruditapes decussatus*). Les zones de production de palourdes dont les limites sont géographiquement définies, sont des gisements naturels répartis sur le littoral au niveau des estrans. D'après les données de l'Institut National des Sciences et Technologie de la Mer (2004), le stock disponible des zones de production est évalué à 1600 tonnes. La période de pêche des palourdes est fixée par la réglementation, et est généralement interdite durant la période allant du 15 mai au 30 septembre. La Direction Générale des Services Vétérinaires est l'autorité compétente en matière de contrôle des conditions sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des MBV. Cette filière est un secteur de pointe depuis de nombreuses années, avec la reconnaissance de la Tunisie comme pays exportateur vers l'Union Européenne.

En vue de garantir la sécurité sanitaire des produits mis sur le marché, chaque zone de production fait l'objet d'un système de contrôle de santé publique et de surveillance de la production des MBV. En outre les MBV doivent

séjourner dans des établissements de purification agréés par l'autorité compétente, et répondre entre autres, aux critères microbiologiques réglementaires. La réglementation tunisienne relative aux critères microbiologiques auxquels doivent répondre les MBV avant leur mise sur le marché, fortement inspirée de textes européens, a retenu *Salmonella* sp. et *Escherichia coli* en tant que critères de sécurité pour les MBV. Par ailleurs, même si la réglementation européenne (Règlement CE n° 2073 /2005 modifié par le Règlement CE n° 1441/2007) préconise la mise au point de méthodes fiables pour l'évaluation du risque lié à *V. parahaemolyticus* dans les MBV, ce pathogène n'a pas été retenu en tant que critère de sécurité (ANSES, 2012).

En conséquence, les analyses microbiologiques de routine des produits de la mer comprennent rarement la recherche de *V. parahaemolyticus* en Tunisie, et par conséquent peu d'informations sur la prévalence de ce pathogène y sont disponibles. D'autre part, la présence de *V. parahaemolyticus*, n'est pas mise en corrélation avec les bactéries indicatrices de contamination d'origine fécale telle que *Escherichia coli* ; de plus les procédés de purification des coquillages peuvent s'avérer être inefficaces pour éliminer les vibriions marins présents naturellement dans les MBV (FAO, 2003).

Cette étude présente un intérêt sanitaire puisqu'elle contribue à améliorer les données encore trop restreintes sur les niveaux de contamination des MBV par *V. parahaemolyticus*, et ce par l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, dont l'objectif est d'étudier la prévalence des *V. parahaemolyticus* dans les MBV purifiés et mis sur le marché en Tunisie pendant la campagne de pêche, et d'autre part de rechercher par méthode moléculaire les gènes des hémolysines *tdh* et *trh*, afin de distinguer les souches de *V. parahaemolyticus* pathogènes.

Matériels et méthodes

Echantillons

L'étude a été menée sur 70 échantillons de palourdes purifiées (*Ruditapes decussatus*), prélevés de façon aléatoire dans différents points de vente en Tunisie pendant la campagne de pêche s'étalant du 1^{er} octobre 2012 au 15 mai 2013.

Chaque échantillon provient d'un lot différent et correspond à environ 1 kg de palourdes conditionnées dans un filet. Le lot étant constitué de palourdes collectées le même jour et provenant d'une même zone

Tableau I

Zone de production	Nombre de lots produits pendant la campagne 2012-2013	Nombre de lots objets de notre étude
Sfax	82	50
Gabès	76	20
Total	158	70

Plan d'échantillonnage.
Sampling Plan.

Tableau II

	Amorce	Séquence	Taille des produits PCR (pb)
pR72H	VP32 VP33	CGAATCCTTGAACATACGCAGC TGCGAATTCGATAGGGTGTAAACC	387 ou 320
<i>tdh</i>	L- <i>tdh</i> R- <i>tdh</i>	CCATCTGTCCTTTTCCTGC CCAAATACATTTTACTTGG	373
<i>trh</i>	L- <i>trh</i> R- <i>trh</i>	GGCTCAAATGGTTAAGCG CATTCCGCTCTCATATGC	250

Séquences des nucléotides utilisées comme amorces pour les PCR.
Sequences of the nucleotides used as primers for PCR.

de production. Le plan d'échantillonnage est présenté dans le **tableau I**. Il est à noter que pendant la campagne de pêche 2012-2013, 925 tonnes de palourdes ont été récoltées : 75 % proviennent des zones de collecte de Sfax, 20 % proviennent de celles de Gabès et 5 % proviennent de celles de Médenine (régions du sud de la Tunisie).

Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une caisse isotherme et ont été analysés dans les deux heures qui ont suivi le prélèvement.

Isolement et identification phénotypique de *V. parahaemolyticus*

La recherche de *V. parahaemolyticus* dans les échantillons de palourdes a été effectuée selon la méthode normalisée ISO/TS 21872-1:2007. La prise d'essai correspond à 25 grammes de chair et de liquide intervalvaire, prélevés aseptiquement à partir de l'échantillon. L'isolement a été effectué par ensemencement en surface du milieu gélosé au Thiosulfate, au Citrate, à la Bile et au Saccharose (TCBS) (Biokar Diagnostics, France).

Toutes les colonies transparentes à centre vert ou bleues verdâtres (saccharose négatives), isolées sur TCBS et évocatrices de *V. parahaemolyticus* ont été repiquées sur gélose Marine Agar (Zobell Marine Agar, Himedia®, Inde), les milieux ont été incubés pendant 24 heures à 37°C. Les mêmes colonies ont été parallèlement conservées à - 80 °C.

L'identification biochimique a été poursuivie sur un total de 18 colonies, les bactéries sont à coloration de Gram négative et oxydase positives (Microbiologie Bactident® Oxydase, Merck KGaA, Allemagne) par l'ensemencement d'une galerie *Enterobacteriaceae* API 20 E (Kit commercial Biomerieux, Marcy l'Étoile, France).

Caractérisation moléculaire de *V. parahaemolyticus*

Identification de l'espèce

Les colonies conservées à - 80°C ont été repiquées sur gélose TCBS pour une identification moléculaire de l'espèce. Une souche de référence de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802T a été utilisée comme témoin. L'extraction et la purification de l'ADN ont été faites en utilisant des kits d'extraction (ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep™, Zymo Research, USA).

Le **tableau II**, présente les séquences des nucléotides utilisées comme amorces pour les PCR. Les amorces spécifiques de l'espèce *V. parahaemolyticus*, VP32 et VP33, correspondent à une séquence PR72H, clonée à partir d'une souche de *V. parahaemolyticus* (Lee *et al.*, 1995).

Le mélange réactionnel de 50 µl est constitué de 25 µl de tampon (1X Reaction Buffer, ZymoTaq™ DNA Polymerase, Zymo Research, USA), 0,5 µl dNTP à 0,25 mM chacun (ZymoTaq™ DNA Polymerase, Zymo Research, USA), 2 µl d'amorce VP32 à 1 µM, 2 µl d'amorce VP33 à 1 µM, 2 unités de Taq polymérase (0,4 µl) (ZymoTaq™ DNA Polymerase, Zymo Research, Zymo Research, USA), et 5 µl d'ADN.

Après une première étape de dénaturation de 10 minutes à 95 °C, 35 cycles d'amplification (94 °C - 30 secondes / 60 °C - 30 secondes / 72 °C - 30 secondes) et une étape d'élongation (72 °C - 7 minutes) ont été conduits dans le thermocycleur (GeneAmp*, PCR System 9700, Applied Biosystems) (Rosec *et al.*, 2009).

Les produits PCR ont été visualisés par coloration (RedSafe™ Nucleic Staining Solution, intron Biotechnology, Corée), après migration par électrophorèse en gel

N° de l'échantillon	Caractéristiques de la colonie (TCBS)	Identification biochimique (API 20E)	Amplification du fragment pR72H (gènes <i>tdh</i> et <i>trh</i>)
Souche de référence ATCC 17802T	Transparentes à centre vert	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Positive
1	Transparentes à centre vert	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Positive (gène <i>trh</i> +)
2	Bleues	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Négative
3	Bleues	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Négative
4	Bleues	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Négative
5	Bleues	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Négative
6	Vertes	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Négative
7	Vertes	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Négative
8	Transparentes à centre vert, collantes	<i>Vibrio vulnificus</i>	Négative
9	Bleues violacées	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Négative
10	Vertes blanchâtres	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Négative
11	Vertes blanchâtres	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Négative
12	Vertes (centre noir)	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Négative
13	Transparentes à centre vert, collantes	<i>Vibrio vulnificus</i>	Négative
14	Vertes en profondeur de la gélose	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Négative
15	Bleues	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Négative
16	Vertes blanchâtres	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Négative
17	Transparentes à centre vert, reflets jaunâtres	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Négative
18	Transparentes à centre vert, reflets jaunâtres	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Négative

Tableau III

Résultats de l'identification biochimique et moléculaire.
Results of biochemical and molecular identification.

d'agarose à 1,5 %. La taille des produits amplifiés par PCR est présentée dans le tableau II.

Détection des gènes de virulence *tdh* et *trh*

La détection des gènes de virulence a été effectuée lorsque l'amplification du fragment pR72H s'est révélée positive. Les séquences des oligonucléotides utilisées comme amorces pour la détection des gènes de virulence *tdh* et *trh* sont présentées dans le tableau II (Bej *et al.*, 1999). Seules les concentrations des amorces (à 0,4 µM chacune), ainsi que les températures d'hybridation ont été modifiées par rapport aux conditions d'amplification retenues pour la séquence pR72H. Ainsi, après une première étape de dénaturation de 10 minutes à 95 °C, 35 cycles d'amplification (94 °C - 30 secondes / 55 °C - 30 secondes / 72°C - 30 secondes) et une étape d'élongation (72°C - 7 minutes) ont été conduits dans le thermocycleur (Rosec *et al.*, 2009).

La taille des produits amplifiés par PCR est présentée dans le tableau II.

Résultats et discussion

Les résultats des identifications biochimique et moléculaire, des souches isolées à partir des échantillons objets de cette étude figurent dans le **tableau III**.

Il est à noter que des colonies jaunes (saccharose positives), sur TCBS, ont été isolées sur tous les échantillons ; l'identification biochimique de ces colonies a montré qu'il s'agit de souches de *Vibrio alginolyticus*.

Notre étude a montré la présence d'une seule souche de *V. parahaemolyticus*, confirmée par PCR (**Figure 1**), sur les 70 échantillons étudiés, soit une prévalence de 1,4 %. Cette souche s'est avérée porteuse uniquement du gène de virulence *trh* (**Figure 2**).

Qualité bactériologique globale des palourdes

L'identification biochimique des colonies isolées sur gélose TCBS, a montré la présence de plusieurs espèces bactériennes appartenant principalement aux genres *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* et *Shewanella*. Il s'agit d'espèces bactériennes habituellement isolées du milieu marin, donc fréquemment retrouvées dans les produits de la mer ; la majorité d'entre elles sont des agents d'altération. En effet, dans son avis rendu le 2 décembre 1999 concernant la pathogénicité des vibrions, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (A.N.S.E.S.), reconnaît deux types de vibrions pathogènes par voie alimentaire et véhiculés par les produits de la mer. Il s'agit des *Vibrio cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 et *V. parahaemolyticus* (Hervio-Heath *et al.*, 2002).

Parmi les vibrions isolés dans cette étude, *Vibrio alginolyticus* est le plus fréquent. Cette espèce a en effet, été isolée de la totalité des échantillons.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Croci *et al.* (2001). D'après l'étude réalisée par cet auteur, sur un total de 726 espèces bactériennes isolées à partir d'échantillons de moules dans les aires de production, 46,9 % appartiennent au genre *Vibrio* (68 % *Vibrio*

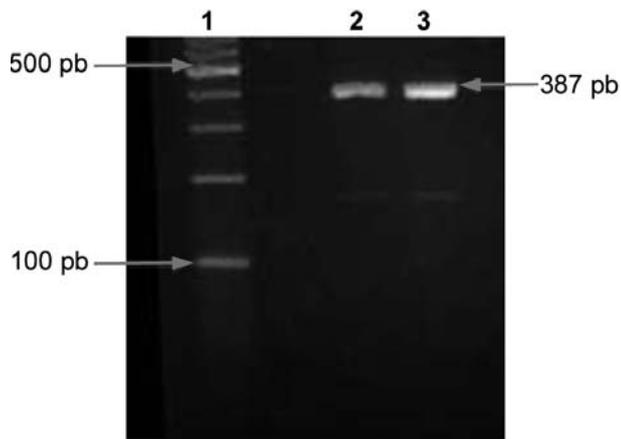


Figure 1

Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification de la séquence pR72H. 1 : Marqueur de poids moléculaire (DNA Marker 100 pb), 2 : souche de *Vibrio parahaemolyticus* isolée, 3 : souche de référence de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802T.

Agarose gel electrophoresis of the amplification products of the sequence pR72H. 1: Molecular weight marker (DNA Marker 100 pb), 2: strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated, 3: reference strain *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802T.

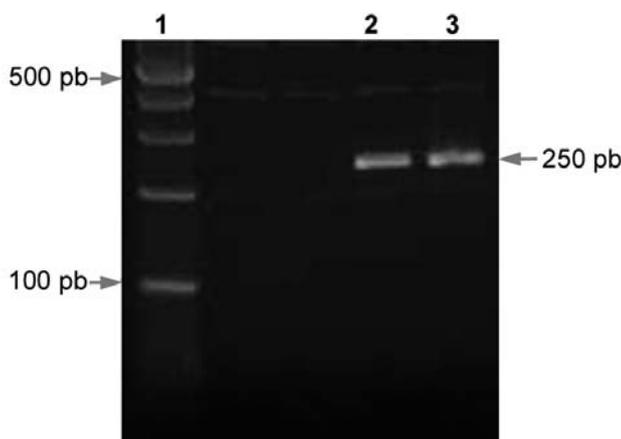


Figure 2

Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification du gène de virulence trh. 1 : Marqueur de poids moléculaire (DNA Marker 100 pb), 2 : souche de référence de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802T porteuse du gène trh, 3 : souche de *Vibrio parahaemolyticus* isolée porteuse du gène trh.

Agarose gel electrophoresis of the amplification products of virulence trh gene. 1: Molecular weight marker (DNA Marker 100 pb), 2: reference strain of *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802T carrier of trh gene, 3: strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated carrier of trh gene.

alginolyticus), 29,8 % au genre *Aeromonas* et 23,3 % au genre *Pseudomonas*.

D'après Rossec *et al.* (2009), le milieu de culture TCBS, peut s'avérer non sélectif vis à vis d'espèces bactériennes d'origine marine autres que les vibrions ; cette donnée a été confirmée par notre étude.

Identification et prévalence de *V. parahaemolyticus* dans les échantillons de palourdes

Notre étude a montré la présence d'une seule souche de *V. parahaemolyticus*, confirmée par PCR, sur les 70 échantillons étudiés, soit une prévalence de 1,4 %. Deux souches de *V. parahaemolyticus* identifiées biochimiquement, n'ont par ailleurs pas été confirmées par PCR. La technique PCR offre une meilleure spécificité que les méthodes phénotypiques (Cohen *et al.*, 2007). La prévalence de *V. parahaemolyticus* dans notre étude, est inférieure à celle trouvée au Maroc par Cohen *et al.* (2007) et qui est de 10 %.

Les densités de *V. parahaemolyticus* dans l'eau, et par conséquent dans les produits de la mer, présentent une variabilité saisonnière avec des valeurs plus élevées pendant les mois chauds (Mahoney *et al.*, 2010). Ainsi, l'étude réalisée par Croci *et al.* (2001) sur des échantillons de moules prélevés directement du milieu marin (mer Adriatique) montre que sur un total de 726 souches bactériennes isolées, 4,7 % correspondent à des souches de *V. parahaemolyticus* et la majorité de ces souches a été isolée pendant la saison estivale. D'après ces mêmes auteurs, les vibrions peuvent se trouver sous une forme viable non cultivable particulièrement pendant les saisons froides de l'année. Panicker *et al.* (2004), ont trouvé un taux de contamination d'huîtres, provenant de la grande distribution au Mexique, par *V. parahaemolyticus* de 83,3 % (25/30). L'étude réalisée par ces auteurs s'est déroulée pendant la saison chaude. En France, des plans de surveillance de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) ont été mis en œuvre sur des échantillons de coquillages mis sur le marché. En 2010, 46 échantillons d'huîtres ont été analysés de mai à septembre. L'espèce *V. parahaemolyticus* a été détectée dans 16 échantillons, soit une prévalence de 34,8 %. La faible prévalence retrouvée par notre étude, pourrait donc être expliquée par le fait qu'elle a été réalisée pendant la saison froide de l'année (octobre à mai), période pendant laquelle la collecte des palourdes est permise par la réglementation en vigueur.

D'autre part, les échantillons utilisés dans notre étude ont fait l'objet d'un procédé de purification avant d'être

mis sur le marché. Or, ce procédé, même s'il ne permet pas de maîtriser totalement le risque lié aux vibrions dans les MBV, il contribue à y réduire le nombre. D'après Croci *et al.* (2001), la purification permet une réduction respective du nombre de *V. parahaemolyticus* et d'*Escherichia coli* d'environ 1 log et 3 log. Le procédé de purification peut également être à l'origine de l'apparition de formes viables non cultivables de vibrions. Par conséquent, il serait intéressant de compléter cette étude par des travaux visant la recherche de *V. parahaemolyticus* dans les zones de collecte des palourdes en Tunisie pendant la saison chaude.

Par ailleurs, d'après Rosec *et al.*, (2009), bien que la méthode normalisée d'isolement de *V. parahaemolyticus* ISO/TS 21872-1:2007 recommande l'utilisation du milieu de culture TCBS. Celui-ci peut s'avérer non sélectif vis à vis d'autres espèces compétitives et être à l'origine de résultats faussement négatifs. Afin d'améliorer la sensibilité de la méthode, Rosec *et al.*, (2012) recommandent l'utilisation de techniques PCR appliquées directement sur le bouillon d'enrichissement des échantillons en préconisant l'ajout d'un contrôle d'inhibition.

D'après Wang *et al.* (2013), la technique Ethidium MonoAzide-PCR (EMA-PCR) permet de détecter l'ADN des formes de *V. parahaemolyticus* viables non cultivables. En effet, l'EMA est un colorant fluorescent, capable de pénétrer uniquement dans les cellules des bactéries mortes et d'empêcher l'amplification de leur ADN. Il serait judicieux d'adopter ce type de méthode dans des études ultérieures en Tunisie afin d'améliorer les connaissances sur les taux de contamination des MBV par *V. parahaemolyticus* et de permettre la détection des formes viables non cultivables de cette espèce, d'autant plus que ces formes pourraient conserver leur pouvoir pathogène.

Virulence des souches de *V. parahaemolyticus*

Les résultats de notre étude ont montré la présence d'une seule souche de *V. parahaemolyticus*; cette souche s'est avérée porteuse uniquement du gène de virulence *trh*.

Le pouvoir pathogène de *V. parahaemolyticus* est lié principalement à la présence de deux hémolysines, la *tdh* et la *trh*. Dans le milieu naturel les souches porteuses des gènes *tdh* et *trh* codant pour ces hémolysines sont rares et représentent 0,2% à 5% des souches isolées. Les souches portant le gène *tdh* sont plus virulentes et elles sont retrouvées dans 95% des cas d'infections humaines (ANSES, 2012). Par ailleurs, d'après Mahoney *et al.* (2010), certaines souches de *V. parahaemolyticus* non porteuses des gènes de virulence, pourraient exprimer les promo-

teurs de ces gènes lorsque la température de l'eau augmente et dépasse 37°C.

En France, d'après les résultats des plans de surveillance de la DGCCRF en 2010, sur les 16 souches de *V. parahaemolyticus* isolées à partir d'échantillons d'huîtres mis sur le marché (n = 46), 5 souches se sont révélées porteuses du gène *trh* et une souche était porteuse du gène *tdh*. La découverte de ces souches a donné lieu à des investigations dans les départements de production des coquillages correspondants (ANSES, 2012).

Conclusion

Les résultats de notre étude réalisée en Tunisie, dont l'objectif est de procéder à l'identification moléculaire des *Vibrio parahaemolyticus* potentiellement pathogènes dans le cadre de la surveillance sanitaire des réseaux de collecte des palourdes (*Ruditapes decussatus*) en Tunisie, ont montré un taux de contamination très faible (1,4 % soit 1/70). La souche de *V. parahaemolyticus* isolée s'est révélée porteuse du gène de virulence *trh*, et donc potentiellement pathogène. Ainsi le risque lié aux vibrions dans les MBV n'est pas totalement maîtrisé par la purification, d'où l'importance d'associer à ce procédé d'autres mesures préventives telles que le respect de la chaîne du froid et la cuisson. Même si ces résultats contribuent à améliorer les connaissances sur les taux de contamination des coquillages en Tunisie par *V. parahaemolyticus*, ils restent encore insuffisants pour apprécier le risque lié à la présence de ce pathogène dans les MBV. Il serait donc judicieux de compléter cette étude par d'autres travaux qui viseraient particulièrement la recherche de *V. parahaemolyticus* pathogènes dans les zones de collecte des palourdes en Tunisie et pendant aussi bien la saison froide que la saison chaude. De même, il serait intéressant de mener d'autres études sur la prévalence de *V. parahaemolyticus* en Tunisie en utilisant des méthodes moléculaires qui permettent de détecter les souches viables non cultivables.

Remerciements

Nos remerciements s'adressent à Monsieur Jean-Philippe ROSEC, responsable unité biologie au Service Commun des Laboratoires, laboratoire de Montpellier, France, qui nous a gracieusement fourni le protocole détaillé de l'identification moléculaire de *V. parahaemolyticus*.

Bibliographie

ANSES, 2012 – *Evaluation du risque lié à Vibrio parahaemolyticus lors de la consommation de coquillages vivants*. Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective, Saisine n° 2010-SA-0301, 13 pp.

Bej A.K., D.P. Patterson, C.W. Brasher, M.C.L. Vickery, D.D. Jones, C.A. Kaysner, 1999 – Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods*, **36** : 215-225.

Cohen N., H. Karib, J. Ait Saïd, L. Lemee, A. Guénoilé, M.L. Quilici, 2007 – Prévalence des vibrions potentiellement pathogènes dans les produits de la pêche commercialisés à Casablanca (Maroc). *Revue Méd. Vét.*, **158** : 562-568.

Croci L., P. Serratore, L. Cozzi, A. Stacchini, S. Milandri, E. Suffredini, L. Toti, 2001 – Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett. appl. Microbiol.*, **32** : 57-61.

FAO, 2003 – *Evaluation des risques pour Campylobacter spp. dans les poulets et pour Vibrio spp. dans les produits de la pêche*. Rapport d'une consultation mixte FAO/OMS d'experts, 5-9 août 2002, Bangkok, Thaïlande. FAO Publ., Rome, 66 pp.

Hervio-Heath D., R.R. Colwell, A. Derrien, A. Robert-Pillot, J.M. Fournier, M. Pommepuy, 2002 – Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. appl. Microbiol.*, **92** : 1123-1135.

Lee C.Y., S.F. Pan, C.H. Chen, 1995 – Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Appl. environ. Microbiol.*, **61** : 1311-1317.

Lesne J., J.M. Fournier, 2005 – *Vibrio*. In : *Bactériologie alimentaire - Compendium d'hygiène des aliments*. M. Federighi (éd.), Economica, Paris, pp : 189-217.

Mahoney J.C., M.J. Gerding, S.H. Jones, C.A. Whistler, 2010 – Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Appl. environ. Microbiol.*, **76** : 7459-7465.

Panicker G., D.R. Call, M.J. Krug, A.K. Bej, 2004 – Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. *Appl. environ. Microbiol.*, **70** : 7436-7444.

Robert-Pillot A., A. Guénoilé, J.M. Fournier, 2002 – Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. *FEMS Microbiol. Letters*, **215** : 1-6.

Rosec J.P., M. Simon, V. Causse, M. Boudjemaa, 2009 – Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using pR72H or *toxR* targets with a culture method. *Int. J. Food Microbiol.*, **129** : 136-145.

Rosec J.P., V. Causse, B. Cruz, J. Rauzier, L. Carnat, 2012 – The international ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, **157** : 189-194.

Wang L., Q. Zhong, L. Zhenlin, 2013 – Specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state by EMA-LAMP technique. In: *4th International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, IPCBEE Vol 50, pp : 169-173.

Received March 2015
Accepted September 2015
Published electronically October 2015
www.marinelife-revue.fr