

ENSP
ECOLE NATIONALE DE
LA SANTE PUBLIQUE

RENNES



Ingénieur du Génie Sanitaire

Promotion : **2005-2006**

Date du Jury : **28 Septembre 2006**

**Evaluation des risques sanitaires liés aux
vibrions non cholériques dans le contexte
des centrales nucléaires de bord de mer**

Présenté par : Emilie FARAMA

Référent professionnel : France WALLET

Référent pédagogique : Jean LESNE

Lieu de stage : Service des Etudes Médicales,
EDF - GDF (Paris)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Docteur Jacques Lambrozo, Directeur du Service des Etudes Médicales, et le Docteur Pierre-André Cabanes, Directeur-Adjoint, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe pendant la durée de mon stage.

Je remercie plus particulièrement ma maître de stage France Wallet, responsable des risques microbiologiques, pour sa disponibilité et son encadrement tout au long de mon stage, malgré ses impératifs personnels...J'en profite également pour lui adresser mes félicitations.

J'exprime toute ma gratitude à Aurélie Touron, de la Recherche et Développement d'EDF pour sa disponibilité et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée.

Je remercie également Jean Lesne, mon référent pédagogique, pour ses conseils et son aide dans la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier les différents interlocuteurs rencontrés lors des visites sur site pour l'excellent accueil qu'il nous ont réservé et pour leurs explications techniques. Je pense plus particulièrement à Christophe Louis-dit-Guérin, de la centrale nucléaire de Flamanville, Jean-Pierre Kusz, de la centrale de Gravelines, Jean-Michel Facqueur de la société Aquanord, Edith et Régis Delesmont de l'Institut Pasteur de Lille.

Mes remerciements s'adressent évidemment aux membres du Service des Etudes Médicales d'EDF-GDF pour leur accueil, leur disponibilité et leur contribution au bon déroulement de mon stage, ainsi qu'aux stagiaires Boravine et Aleksandra, qui ont su créer une ambiance de travail très agréable et me faire part de leur expérience.

Abstract

Health risk assessment of non cholera vibrios
around seaside nuclear power plants.

Non cholera vibrios live naturally in marine environment. Eleven species are pathogenic for humans, and can lead to gastroenteritis, septicaemias and wound infections, further to seafood consumption or open wounds exposure to seawater. Cell numbers typically increase when water temperature is higher than 20 °C. EDF is sensitive to vibrios issue because waters of nuclear power plants cooling system are discharged in seawater, which create a local warming of it, favoring vibrios development. So, a regular surveillance is exercised. Considering the climate warming and possible evolutions of vibrios rules, the company considered necessary to make a point on the sanitary risks linked to non cholera vibrios. The aim of this study is to judge the feasibility of a quantitative risk assessment and to suggest a global methodology for seaside sites.

The report suggests a methodology for seaside nuclear power plants, with a concrete application on Gravelines site. It insists particularly on the first three stages of the assessment : hazard identification, hazard characterization and exposure assessment. Only exposure by ingestion could be studied ; the report suggests a method to know vibrios' rate in seafood since its fishing until its consumption. A collection of data as complete as possible was made.

The first stage allowed to retain three species of sanitary interest : *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. These species were studied in detail. For the exposure by ingestion, the study brings to the fore the essential role of temperature during food storage on food contamination. It also insists on the lack of data and so on the uncertainties bound to hypothesis. The risk further to an exposition by contact seems to be important but is not quantifiable. For EDF, it appears necessary to maintain, even to increase, the surveillance to observe vibrios evolution, in terms of variety and concentration.

Sommaire

Introduction	1
1 Contexte de l'étude	3
1.1 Généralités sur les vibrions	3
1.2 Un problème susceptible de se développer	4
1.3 En quoi la société EDF est-elle concernée par cette problématique ?	5
1.4 Surveillance menée par EDF	5
1.5 Aspects réglementaires	7
2 Eléments pour la réalisation d'une ERS	11
2.1 Site d'étude.....	11
2.1.1 Choix du site	11
2.1.2 Caractérisation du site	11
2.1.3 Définition de la zone d'étude.....	12
2.2 Identification des dangers	15
2.3 Caractérisation des dangers.....	16
2.3.1 <i>Vibrio cholerae</i>	17
2.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19
2.3.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	23
2.4 Exposition.....	27
2.4.1 Voies d'exposition et population exposée	27
2.4.2 Approche globale de l'estimation de l'exposition par ingestion.....	29
2.4.3 Concentration initiale en vibrions dans l'aliment	30
2.4.4 Concentration en vibrions pathogènes dans l'aliment lors de la récolte	33
2.4.5 Evolution de la concentration en vibrions pathogènes dans l'aliment jusqu'à sa consommation	33
2.4.6 Schéma de consommation	36
2.5 Application à Gravelines	37
2.5.1 Calcul de la dose d'exposition	37
2.5.2 Caractérisation du risque	38
3 Discussion	39
3.1 Limites et incertitudes.....	39
3.2 Importance des différents paramètres et gestion du risque	40
3.3 Perspectives et recommandations pour EDF	42
Conclusion	45
Bibliographie	47
Liste des annexes	I

Liste des tableaux

Tableau 1 : Surveillance des vibrions sur les sites EDF	6
Tableau 2 : Valeurs limites en <i>V. parahaemolyticus</i> dans les produits de la mer.....	8
Tableau 3 : Niveaux de risque en fonction du nombre de <i>V. parahaemolyticus</i>	9
Tableau 4 : Critères de sélection des espèces de vibrions non cholériques	16
Tableau 5 : Fréquence des formes cliniques associées à <i>V. cholerae</i>	17
Tableau 6 : Fréquence des formes cliniques associées à <i>V. parahaemolyticus</i>	20
Tableau 7 : Caractéristiques des infections à <i>V. parahaemolyticus</i>	20
Tableau 8 : Fréquence des formes cliniques associées à <i>V. vulnificus</i>	24
Tableau 9 : Etudes reliant la température de l'eau et la quantité de vibrions	32
Tableau 10 : Quantités de poissons consommées par repas.....	36
Tableau 11 : Quantités de coquillages et crustacés consommées par repas	37
Tableau 12 : Quantités moyennes estimées de vibrions (UFC)	38
Tableau 13 : Doses d'exposition aux vibrions par repas (UFC)	38

Liste des figures

Figure 1 : Localisation des principales activités à proximité du site	14
Figure 2 : Relation dose-réponse pour <i>V. parahaemolyticus</i>	23
Figure 3 : Relation dose-réponse pour <i>V. vulnificus</i>	26
Figure 4 : Schéma d'exposition	28
Figure 5 : Etapes de l'évaluation de l'exposition par ingestion	30
Figure 6 : Estimation de la quantité de vibrions dans les coquillages	41
Figure 7 : Effet de la durée du stockage des coquillages à l'air ambiant.....	41
Figure 8 : Effet de la réfrigération des coquillages sur la quantité de vibrions	42

Liste des sigles utilisés

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CNR : Centre National de Référence

DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

DL50 : Dose létale 50

DRAM : Direction Régionale des Affaires Maritimes

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations

GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat

Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

Ineris : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

LPS : Lipo polysaccharide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

USFDA : United States Food Drug Administration

INTRODUCTION

Depuis le milieu du XIX^e siècle, les conséquences de la circulation de microorganismes pathogènes dans l'environnement ont largement été atténuées. Ceci s'explique par des connaissances accrues des microorganismes, la mise en place de règles d'hygiène, l'usage d'antibiotiques... Ainsi, au milieu du XX^e siècle, les hygiénistes ont pu penser que les épidémies d'origine hydrique ou alimentaire dues à ces pathogènes avaient disparu dans les pays industrialisés. L'attention s'est alors portée sur les dangers liés aux nouvelles substances chimiques largement utilisées dans de nombreux domaines et sur leurs effets à long terme. C'est ainsi qu'est née la démarche d'évaluation des risques. Depuis une vingtaine d'années, l'actualité rappelle toutefois que les microorganismes évoluent, et que les maladies infectieuses sont toujours présentes. Aujourd'hui, l'évaluation des risques microbiologiques a ainsi une place grandissante.

L'évaluation du risque lié à la contamination biologique est globalement plus difficile à apprécier que le risque lié aux substances chimiques. Ce risque dépend de quatre facteurs complexes et variables dont l'évolution est souvent imprévisible : la survie, la prolifération, la dissémination des agents biologiques dans les écosystèmes et leurs effets directs et indirects sur la santé. Dans le plupart des cas, la quantification du risque n'est pas réalisable avec précision, du fait du manque de données sur les probabilités d'exposition et sur les relations dose-réponse des pathogènes.

De par ses activités, l'entreprise EDF est particulièrement concernée par les risques microbiologiques liés à l'environnement. On pense notamment aux légionelles et aux stratégies de prévention, de surveillance et d'action associées mises en place par l'entreprise. Si l'impact médiatique des légionelles est très important, il faut savoir que d'autres bactéries, comme les vibrions, sont aussi surveillées. Les vibrions sont très connus car l'un d'entre eux, le vibron cholérique, est à l'origine du choléra, qui sévit toujours dans certains pays d'Afrique et d'Asie. Mais certaines espèces de vibrions non cholériques sont aussi pathogènes pour l'homme. Ces espèces vivent naturellement dans le milieu marin et peuvent provoquer des infections suite à un contact avec la mer ou ses produits. Il existe peu de réglementation concernant les vibrions, mais l'attention portée à ces microorganismes par l'USFDA, la FAO et l'OMS laisse présager des évolutions.

Le sujet de ce stage est ainsi né d'une demande de la Division Production Nucléaire d'EDF au Service des Etudes Médicales d'EDF-GDF de faire le point sur les risques sanitaires liés aux vibrions et sur la réglementation existante. Le SEM a alors proposé de réaliser une évaluation des risques sanitaires liés aux vibrions non cholériques. L'objectif de ce mémoire est donc d'apprécier la faisabilité d'une évaluation quantitative des risques sanitaires liés aux vibrions non cholériques et de proposer une méthode d'évaluation applicable à l'ensemble des sites. La première partie s'attachera à présenter le contexte sanitaire, industriel et réglementaire lié aux vibrions. Le recueil des données nécessaires à l'évaluation des risques sera ensuite réalisé, et l'évaluation sera menée en parallèle sur un exemple concret. Enfin, la troisième partie permettra de dresser le bilan de l'étude et de proposer des recommandations pour EDF.

1 Contexte de l'étude

1.1 Généralités sur les vibrions

Les vibrions sont des microorganismes procaryotes, appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, qui regroupe quatre genres : *Vibrio*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, et *Aeromonas*. Ils sont bien connus en pathologie humaine car l'un d'entre eux, le vibron cholérique, a été à l'origine de plusieurs pandémies de choléra depuis le XIX^e siècle. Les vibrions cholériques appartiennent aux sérogroupes O1 et O139 de l'espèce *Vibrio cholerae* (Lesne *et al.*, 2005). De nombreux pays africains et asiatiques (Angola, Soudan, Guinée, Congo, Ghana, Inde) sont actuellement touchés par des épidémies de choléra (International Society for Infectious Diseases, 2006). Dans les pays européens, ces épidémies ont disparu depuis de nombreuses années, et l'on pourrait penser que cette bactérie ne pose pas de problème de santé publique en France aujourd'hui. Toutefois, il existe d'autres espèces de vibrions potentiellement pathogènes pour l'homme. Ces vibrions sont dits « non cholériques ». Si **plus de 80 espèces du genre *Vibrio*** sont connues à ce jour, seulement **onze d'entre elles sont potentiellement pathogènes pour l'homme**. Il s'agit des vibrions appartenant aux sérogroupes non-O1/non-O139 de l'espèce *V. cholerae* et de dix autres espèces : *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Il faut noter que l'espèce *Vibrio damsela*, considérée comme pathogène pour l'homme, appartient aujourd'hui au genre *Photobacterium* (Lesne *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005).

Contrairement à de nombreux pathogènes entériques, les vibrions sont bien adaptés pour survivre en dehors de l'hôte humain. **Ils vivent naturellement dans le milieu marin**, plus particulièrement dans les eaux côtières et estuariennes. Des études ont montré leur capacité à survivre dans des environnements aquatiques, soit libres dans l'eau, soit associés à des animaux (vertébrés ou invertébrés), au plancton (notamment aux copépodes¹) ou encore adsorbés sur les sédiments (Dumontet *et al.*, 1996; Powell, 1999). **Leur cycle biologique est fortement influencé par la température de l'eau**. Ainsi, en saison froide, les vibrions survivent dans les sédiments sous une forme viable non cultivable ; lorsque la température de l'eau s'élève, au-dessus de 15-20 °C, ils se multiplient et sont à nouveau détectables dans l'eau de mer et dans ses produits (mollusques, poissons, crustacés) (Strom *et al.*, 2000).

L'homme entre en contact avec ces vibrions par l'intermédiaire de la mer (contact cutané) ou de ses produits (ingestion de produits contaminés, contact cutané), qui en constituent le réservoir principal. Les infections surviennent le plus souvent sous forme sporadique, mais peuvent être gravissimes ; de nombreuses épidémies ont également été décrites. Pour les cas recensés en France, une saisonnalité marquée pendant la fin de l'été et le début de l'automne, liée aux conditions de développement des vibrions est observée pour les espèces *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. La saisonnalité semble moins marquée pour les espèces *V. cholerae* et *V. alginolyticus* (Geneste *et al.*, 2000; Quilici *et al.*, 2003; Quilici *et al.*, 2005a).

La consommation de fruits de mer crus ou peu cuits est la principale source de contamination, se manifestant alors par des **gastro-entérites et des septicémies** (dont le taux de létalité peut atteindre 75 %). Les principales autres manifestations sont des **infections cutanées ou muqueuses qui surviennent après contact cutané** avec

¹ Petits crustacés

de l'eau de mer ou l'un de ses produits, le plus souvent au niveau d'une lésion préexistante, et qui peuvent entraîner des lésions irréversibles de la peau (Fournier *et al.*, 2002). Une grande diversité de produits de la mer a été impliquée dans la transmission des vibrions aux hommes. On peut ainsi citer les crevettes, moules, huîtres, crabes, poissons, homards, coques, encornets, noix de Saint-Jacques... Aux Etats-Unis, les vibrions sont la principale cause de la mortalité associée à la consommation de produits de la mer, et sont responsables du second plus grand nombre de maladies d'origine alimentaire après le virus de Norwalk (Powell, 1999).

La pathogénicité chez l'homme dépend de la souche infectante et de l'état initial du sujet contaminé. Tous les individus sont susceptibles de développer les formes cliniques associées aux vibrions. Toutefois, **la gravité de l'infection est souvent liée à la présence de pathologies sous-jacentes** (hépatopathies, cancers, antécédents de chirurgie digestive, immunodépression, diabète...). La fréquence des gastro-entérites est probablement sous-estimée, contrairement à celle des infections extra-intestinales. D'après un réseau de surveillance mis en place en Floride entre 1981 et 1993, un taux d'incidence de 4,3 cas/10⁶habitants/an a été estimé. Une autre étude menée sur le risque d'infection suite à la consommation d'huîtres a montré un taux d'attaque de 11,3 cas/10⁶consommateurs/an, passant à 95,4 quand le consommateur est porteur d'une hépatopathie (Fournier *et al.*, 2002).

1.2 Un problème susceptible de se développer

Comme cité précédemment, les vibrions sont sensibles aux variations climatiques saisonnières. Toutefois, les variations aiguës ou globales du climat peuvent également avoir un rôle sur le développement des infections (Parola *et al.*, 2004). Les espèces *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* ont ainsi été classées dans la liste des **maladies sensibles au climat** par l'Académie américaine de microbiologie (Rose *et al.*, 2001).

Selon les modélisations du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) et en fonction des scénarios d'émission considérés, la température moyenne mondiale à la surface pourrait augmenter de 1,4 à 5,8 °C entre 1990 et 2100 (GIEC, 2001). Le réchauffement des eaux pourrait alors entraîner d'une part une extension de l'aire de répartition des vibrions et d'autre part un allongement de la période pendant laquelle ils se multiplient. Les infections pourraient alors augmenter et s'étendre sur une plus longue durée.

Le réchauffement global devrait s'accompagner de l'amplification en fréquence et en intensité des phénomènes météorologiques extrêmes simples (températures très basses ou très élevées) ou complexes (sécheresses, inondations, ouragans). Ces phénomènes climatiques aigus jouent aussi un rôle sur le développement des infections (OMS, 2004a; Parola *et al.*, 2004). Aux Etats-Unis, par exemple, une augmentation du nombre d'infections à *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* non-O1/non-O139 (majoritairement des infections de plaie) a été constatée après le passage de l'ouragan Katrina en 2005 (CDC, 2005c). Il s'agit d'un phénomène cyclique, apparaissant tous les 2 à 7 ans, et caractérisé par un réchauffement anormal des eaux de surface le long des côtes occidentales de l'Amérique latine. Colwell (1996) a montré

. Son rôle dans la recrudescence d'infections à *V. parahaemolyticus* est aussi suspecté (Daniels *et al.*, 2000).

Des facteurs supplémentaires tels que la modification des habitudes alimentaires, avec notamment l'augmentation de la consommation de poissons crus, et l'augmentation de la proportion de sujets immunodéprimés (notamment l'augmentation du nombre de personnes atteintes du sida ou traitées aux immunosuppresseurs) laissent penser que ces infections pourraient être amenées à se développer. Ainsi, ces éléments font des vibrions une **préoccupation grandissante dans divers pays**, même si les pathologies ne présentent pas le caractère de gravité du choléra.

1.3 En quoi la société EDF est-elle concernée par cette problématique ?

Le principe de fonctionnement d'une centrale nucléaire est le même que celui d'une centrale thermique : la centrale génère de la vapeur, cette vapeur fait tourner une turbine qui entraîne un alternateur, produisant alors de l'électricité. La différence réside dans le combustible utilisé pour chauffer l'eau, puisque les centrales nucléaires utilisent de l'uranium, alors que les centrales thermiques utilisent du charbon, du pétrole, ou du gaz.

La production d'électricité nécessite trois circuits d'eau :

- Le premier permet d'extraire la chaleur. La fission de l'uranium dégage de la chaleur, entraînant un réchauffement de l'eau à 320 °C. Cette eau est maintenue sous pression, pour la conserver à l'état liquide, et circule en circuit fermé.
- Le second circuit produit de la vapeur. L'eau du circuit secondaire est en contact avec le circuit primaire, et est ainsi réchauffée. Un générateur de vapeur permet de la transformer en vapeur, qui fait tourner une turbine couplée à un alternateur qui produit l'électricité.
- Le troisième est le circuit de refroidissement. Il permet de condenser la vapeur sortant de la turbine grâce à un condenseur alimenté par de l'eau en provenance de la mer ou d'un fleuve. L'eau condensée est alors renvoyée vers le générateur de vapeur (circuit secondaire), et **l'eau tiède du condenseur est rejetée dans le milieu naturel**. Lorsque le débit de la rivière ou du fleuve est trop faible, ou lorsque l'on veut limiter son échauffement, on refroidit l'eau du condenseur grâce à des tours aéroréfrigérantes. Ce système ne concerne pas les CNPE de bord de mer, puisque l'on considère que l'eau du condenseur est fortement diluée en mer, et que l'impact thermique est donc très faible (Société Française d'Energie Nucléaire, 2002; EDF, 2006).

Selon la puissance des centrales, une différence de température plus ou moins importante (jusqu'à 15 °C) peut être observée entre la prise d'eau et l'eau rejetée. Compte tenu des débits rejetés (38 à 43 m³/s par tranche pour les centrales de bord de mer), cela entraîne une **augmentation locale de la température**, même si une dilution thermique importante est observée. EDF contribue ainsi à créer des conditions plus favorables au développement des vibrions (EDF, 1996).

Il faut savoir aussi que les responsabilités civile et pénale d'EDF peuvent être engagées dans le cas d'infections se déclarant suite à une baignade ou à l'ingestion de produits contaminés (dans ce cas, la responsabilité incombe à l'exploitant qui a mis sur le marché des produits contaminés, mais ce dernier peut désigner les rejets d'EDF comme source de contamination). Le préjudice doit être réparé si un lien de causalité est prouvé ou si la démonstration de la négligence d'EDF est établie.

1.4 Surveillance menée par EDF

Selon l'article L216-6 du code de l'environnement, « le fait de jeter, déverser ou laisser s'écouler dans [...] les eaux de la mer dans la limite des eaux territoriales, directement ou indirectement, une ou des substances quelconques dont l'action ou les réactions entraînent, même provisoirement des effets nuisibles sur la santé ou des dommages à la flore ou à la faune [...] des limitations d'usages des zones de baignade, est puni de deux ans d'emprisonnement et d'une amende. »

Dans ce contexte, pour évaluer l'impact de ses rejets, l'entreprise a mis en place une **surveillance écologique et halieutique de ses sites** qui lui permet de :

- suivre l'évolution naturelle des différents compartiments du milieu marin : pélagique, benthique et halieutique ;
- déceler au regard de l'analyse des suivis annuels depuis leur origine, l'existence ou non d'une évolution de l'écosystème marin ;

- établir dans quelle mesure ces tendances peuvent résulter du fonctionnement de ses centrales.

Cette surveillance inclut le paramètre vibron. Des arrêtés fixent pour chaque site la fréquence des mesures, mais n'imposent pas de seuil à ne pas dépasser. Dix espèces sont suivies : *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. anguillarum*, *V. hollisae*, et *V. damsela* (*Photobacterium damsela*). Ce nombre d'espèces est lié aux limites de l'outil d'identification des souches.

Initialement, les mesures étaient réalisées par divers prestataires, avec des méthodes parfois différentes. Depuis 1999, dans un souci d'homogénéisation des données, EDF a réalisé une comparaison inter-laboratoires de trois méthodes. Deux d'entre elles sont actuellement utilisées sur l'ensemble des sites : une méthode dite « classique » par ensemencement en milieu liquide et une méthode par filtration, développée conjointement par EDF et l'Institut Pasteur de Lille (IPL) (Annexe 1). A partir de 2007, seule la méthode EDF/IPL sera utilisée du fait de sa meilleure représentativité en terme de diversité des souches isolées. Ainsi EDF a encore recours à 5 prestataires pour les analyses, mais les méthodes utilisées sont les mêmes. L'Ifremer est chargé de réaliser les prélèvements pour tous les sites.

Le tableau suivant indique pour chaque site la date du début de la surveillance des vibrions, la fréquence des mesures et présente une synthèse des résultats.

Tableau 1 : Surveillance des vibrions sur les sites EDF

	Début du suivi	Fréquence des mesures	Impact CNPE	[vibrions] _{aval} / [vibrions] _{prise d'eau}	Espèces isolées
Gravelines	1979 (1985-1986)	1/semaine	10 ⁴	10 ² à 10 ³ UFC/l	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. cholerae</i> * <i>V. fluvialis</i> <i>V. damsela</i> <i>V. metschnikovii</i> <i>V. mimicus</i>
Flamanville	1992 (2004)	3/an	1	1 UFC/l	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. cholerae</i> * <i>V. fluvialis</i> <i>V. damsela</i>
Paluel	1992 (2004)	3/an	1	1 UFC/l	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. cholerae</i> *
Penly	1992 (2004)	1 tous les 2 mois	1	1 UFC/l	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>
Blayais	1987 (2004)	8/an	1	10 UFC/l	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. fluvialis</i>

* *V. cholerae* non-O1/non-O139

Les rejets d'EDF sur les sites de Gravelines et du Blayais semblent **contribuer à l'augmentation de la concentration en vibrions dans le milieu proche du rejet**. Il faut toutefois rester prudent quant aux résultats, qui peuvent fortement varier selon le lieu de prélèvement et la méthode utilisée. De plus, la multiplicité des prestataires et le passage d'une méthode à une autre rendent difficile la comparaison des résultats. Sur la plupart des sites, on manque encore de recul quant à la nouvelle méthode EDF/IPL. Il faut aussi penser que des rejets autres que ceux de la centrale peuvent contribuer à l'augmentation de la concentration en vibrions.

L'appréciation de l'évolution de la concentration en vibrions par rapport à la concentration de référence (mesurée en un point situé en dehors de toute influence du fonctionnement du site) fait face aux mêmes limites que celles citées ci-dessus. Il semblerait toutefois que seul le CNPE de Gravelines ait un impact important sur la prolifération des vibrions : après l'implantation de la centrale, leur concentration a été multipliée par un facteur de 10⁴. Une diversification des espèces et des souches a

également été observée à partir de 1984. Il n'y a pas d'impact détectable sur les autres sites.

Il est intéressant de noter que sur tous les sites, sauf celui du Blayais, un traitement au chlore des circuits de refroidissement est effectué lorsque la température de l'eau de mer est supérieure à 10 °C. Une teneur en chlore résiduel suffisante dans tout le circuit de refroidissement permet de supprimer les salissures biologiques, notamment les vibrions. Sur le site de Gravelines, la prolifération en vibrions semble avoir lieu dans le biofilm couvrant les parois du canal de rejet, où le chlore résiduel est absent. L'absence de chloration sur le site du Blayais ne semble pas entraîner une forte prolifération des vibrions. Une hypothèse est que l'eau fortement chargée en matières en suspension a un effet abrasif et empêche ainsi le développement d'un biofilm stable.

1.5 Aspects réglementaires

1.5.1 Eaux de baignade

En 2004, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié un rapport concernant la sécurité des eaux de baignade (OMS, 2004b). Elle rappelle que pour *V. cholerae*, une dose d'au moins 10⁶ bactéries est nécessaire pour provoquer le choléra. Elle estime donc que le risque de contracter une gastro-entérite suite à l'ingestion d'eau lors de la baignade ou des activités nautiques est faible, compte tenu des fortes teneurs qu'il faudrait ingérer. En revanche, **l'OMS considère que le risque d'infections extra-intestinales (infections de plaies et otites) associées aux vibrions pathogènes n'est pas négligeable.**

Au niveau européen, une nouvelle directive (directive 2006/7/CE) concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade a été adoptée le 15 février 2006. Elle fixe notamment les critères microbiologiques auxquels doivent répondre les eaux de baignade. Comme dans la précédente directive, **le paramètre *Vibrio* n'est pas étudié** ; ce texte ne tient donc pas compte du rapport de l'OMS précédemment cité. Le classement des zones de baignade repose sur deux indicateurs de contamination fécale (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux). Comme les vibrions sont des hôtes naturels du milieu marin, ces indicateurs ne sont pas adaptés pour prévenir une éventuelle contamination en vibrions. Dans la littérature scientifique, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence à ce jour entre les vibrions et les indicateurs de contamination fécale.

1.5.2 Eaux conchylicoles

Le classement et la surveillance des zones de production conchylicole ont récemment fait l'objet d'une évolution réglementaire, applicable depuis le 1^{er} janvier 2006 dans le cadre du règlement européen CE/854/2004. Ce texte fixe notamment des seuils de qualité microbiologique permettant de classer les zones conchylicoles. Comme pour les eaux de baignade, la surveillance repose sur des indicateurs de contamination fécale (*E. coli*). Il n'existe donc **pas de réglementation spécifique aux vibrions.**

1.5.3 Produits de la mer

Sur le plan international, l'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) recommandait en 1986 des valeurs limites en *V. parahaemolyticus* dans les produits de la mer.

Tableau 2 : Valeurs limites en *V. parahaemolyticus* dans les produits de la mer recommandées par l'ICMSF

	n	c	Bactérie/g ou /cm ²	
			m	M
Poisson frais et surgelé et poisson fumé froid	5	2	10 ²	10 ³
Crustacés crus surgelés	5	1	10 ²	10 ³
Crustacés cuits surgelés	5	1	10 ²	10 ³
Chair de crabe cuite, super réfrigérée et surgelée	10	1	10 ²	10 ³
Mollusques bivalves frais et surgelés	10	1	10 ²	10 ³

Où : n = nombre d'échantillons représentatifs

c = nombre maximum d'échantillons pour lesquels la concentration est comprise entre m et M

m = concentration maximale recommandée pour un produit de bonne qualité

M = concentration maximale recommandée pour un produit de qualité acceptable

L'OMC, non directement chargée de la sécurité alimentaire, a fixé un cadre pour l'application de mesures de sécurité des aliments dans les échanges internationaux. En effet, les mesures sanitaires ou phytosanitaires peuvent, par leur nature même, entraîner des restrictions au commerce. Dans ce contexte, un accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires (accord SPS) a été conclu en 1994. Cet accord détermine les conditions dans lesquelles un état peut adopter et mettre en œuvre des mesures sanitaires ou phytosanitaires ayant une incidence directe ou indirecte sur le commerce international. Il renvoie à trois organismes servant de référence (dont le codex alimentarius), mais les pays signataires peuvent adopter des réglementations différentes, sous réserve que les mesures soient expliquées, justifiées, et fondées sur une évaluation du risque reposant sur des critères scientifiques.

Dans ce contexte, et en réponse à la demande du codex alimentarius, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'OMS travaillent actuellement sur l'évaluation des risques liés à *Vibrio spp.* dans les produits de la pêche. Ce travail est certainement préalable à la rédaction de normes, directives ou recommandations.

Au niveau européen, dans le cadre de l'accord SPS, le Comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique a adopté un avis les 19 et 20 septembre 2001 concernant *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* (European Commission, 2001). Le comité est parvenu à la conclusion que **les données scientifiques actuellement disponibles ne justifient pas la définition de critères spécifiques applicables à *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* pathogènes dans les aliments d'origine marine.** Il a cependant recommandé l'établissement de codes de bonnes pratiques d'hygiène. Le règlement (CE) N° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires évoque le problème des vibrions non cholériques et reprend l'avis du Comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique. De plus, le règlement spécifie que les critères donnés dans le document devront être réexaminés pour tenir compte des évolutions scientifiques, technologiques ou méthodologiques. Il insiste sur la nécessité d'élaborer des méthodes d'analyse fiables. Il est en cours d'adaptation au niveau national.

En France, pour l'instant, pour les coquillages et produits de la pêche, seule l'espèce *V. parahaemolyticus* fait l'objet d'un statut particulier (Delarras, 2003) :

- sa recherche dans les coquillages est prévue dans la circulaire DGAL/SVHA/C88/ n° 8003 du 28 avril 1988, seulement lors d'un contrôle renforcé réalisé dans certaines circonstances. La norme est de 0 pour 25 g de chair et de liquide intervalvaire ;
- pour les produits de la pêche, sa recherche ne figure pas dans la note de service du 27 juin 2001 relative aux critères microbiologiques applicables aux aliments.

L'AFSSA a plus récemment émis deux avis concernant les vibrions. Dans l'avis du 2 décembre 1999, l'agence estime que les produits de la mer dans lesquels seraient détectées **les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 ou de *V. vulnificus* ne présentent pas de risque sanitaire particulier**. En revanche, **une surveillance attentive de ces produits est justifiée pour *V. cholerae* O1 et O139 et *V. parahaemolyticus***. Trois niveaux de risque, en fonction du nombre de *V. parahaemolyticus*, ont été définis.

Tableau 3 : Niveaux de risque en fonction du nombre de *V. parahaemolyticus*

Nombre X de <i>V. parahaemolyticus</i> (UFC ² /g)	Niveau de risque
X = 100	Risque négligeable
100 < X ≤ 1 000	Recherche des gènes d'hémolysines par PCR Si résultat positif : risque avéré
X > 1 000	Risque avéré

Dans son avis du 14 août 2002 relatif à l'évaluation des risques liés à la consommation de produits de la pêche importés, contaminés par certaines espèces de *Vibrio* (autre que *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*), l'AFSSA estime que :

- 5 espèces (*V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela* et *V. metschnikovii*) ne présentent pas de risque sanitaire lié à la consommation de produits de la pêche ;
- les risques sanitaires liés aux espèces *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae* et *V. mimicus*, susceptibles d'être détectés dans certains aliments d'origine marine, restent extrêmement faibles, avec l'apparition potentielle de gastro-entérite sans gravité pour la population générale.

Il faut noter aussi qu'actuellement, **seule la recherche de *V. parahaemolyticus* fait l'objet d'une norme**. La norme expérimentale AFNOR V 45-111 (juillet 1985) traite de la recherche de cette espèce dans les eaux conchylicoles et les coquillages marins vivants, et la norme AFNOR V 08-024 (1991) donne les directives générales pour la recherche de cette espèce dans les produits alimentaires (Delarras, 2003). Une nouvelle norme de recherche des vibrions pathogènes (*V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* d'une part, autres vibrions non cholériques d'autre part) est en cours de publication actuellement. La standardisation des techniques d'analyse de routine concernant les *Vibrio* bute actuellement sur la difficulté de l'identification biochimique et la nécessité d'introduire des techniques moléculaires.

A titre de comparaison, l'Annexe 2 présente les réglementations concernant les produits de la mer dans d'autres pays. On constate que la plupart des textes portent sur *V. cholerae* ou *V. parahaemolyticus*. Seuls les Etats-Unis proposent un critère relatif à *V. vulnificus*.

² Unité Formant Colonie

2 Éléments pour la réalisation d'une ERS

Il n'existe pas de démarche spécifique relative à l'évaluation des risques microbiologiques en France. La démarche présentée ici est donc fondée sur la méthodologie propre aux risques chimiques. Toutefois, elle tient compte des approches proposées par la FAO et l'OMS dans le Codex alimentarius (FAO *et al.*, 2001) et par R. Bonnard de l'Ineris (Bonnard, 2001).

La réflexion proposée doit permettre de mener une évaluation des risques sur tout site concerné. Dans la mesure du possible, le recueil des éléments nécessaires a été réalisé pour faire face au plus grand nombre de situations envisageables. L'application à un site particulier a été conduite en parallèle.

2.1 Site d'étude

2.1.1 Choix du site

Parmi les cinq CNPE situés en bord de mer, nous avons choisi de travailler plus spécifiquement sur celui de Gravelines pour diverses raisons :

- tout d'abord, il est étudié depuis de nombreuses années, ce qui permet d'avoir un recul suffisant quant à la problématique des vibrions. La qualité des mesures de surveillance y est meilleure que sur les autres sites et les résultats sont donc plus facilement exploitables. En effet, la méthode de mesures EDF/IPL y est appliquée depuis longtemps, par M. et Mme Delesmont de l'IPL. De plus, le laboratoire est à proximité de la centrale et les échantillons y sont donc traités très rapidement. Par rapport aux autres sites, les résultats de la surveillance sont pour l'instant les plus élevés (ce qui pourrait changer du fait de l'application généralisée de la méthode EDF/IPL) ;

- cette centrale a d'autre part une situation géographique particulière, entre Calais et Dunkerque. Il s'agit d'une zone fortement industrialisée, avec probablement de nombreux rejets en mer, et d'une zone qui semble plus fermée, entraînant ainsi une plus faible dilution des rejets ;

- enfin, Gravelines est un site particulier puisqu'il s'agit pour l'instant du seul site de bord de mer où les eaux du circuit de refroidissement sont utilisées pour alimenter une pisciculture.

2.1.2 Caractérisation du site

Le CNPE de Gravelines est implanté dans le département du Nord, sur le littoral, à mi-distance entre Calais et Dunkerque (Annexe 4). Il se situe à l'ouest de l'avant-port de Dunkerque dans lequel s'ouvre le canal d'amenée de l'eau de refroidissement long de 1 800 m. Après passage dans les circuits, cette eau débouche dans le canal de rejet par des déversoirs, retournant ainsi à la mer.

Il a une capacité importante puisqu'il est constitué de 6 tranches. La plupart du temps, cinq tranches sont en fonctionnement, et une est à l'arrêt. Le débit moyen de rejet des eaux de refroidissement est de 40 m³/s par tranche, soit un débit total de 200 m³/s pour les cinq tranches en fonctionnement. La différence de température entre l'eau du canal d'amenée et l'eau du canal de rejet est fixée par un arrêté. Elle doit être inférieure à 12 °C. **L'échauffement moyen en 2004 a été de 9,6 °C**, avec un maximum de 11 °C.

D'autres sources d'émissions sont possibles. Par exemple, les rejets de l'aquaculture participent à l'augmentation des concentrations en vibrions. En effet, l'eau chaude de refroidissement du CNPE est pompée au niveau des déversoirs pour alimenter les bassins de l'aquaculture. Cette eau chaude est au départ très peu concentrée en vibrions, puisqu'elle est pompée à la sortie des circuits de refroidissement, dont la chloration est normalement suffisante. Toutefois, l'apport important de nutriments dans les bassins de pisciculture contribue à une rapide multiplication des vibrions. Les eaux

piscicoles sont ensuite rejetées dans le canal de rejet de la centrale. Les débits de rejet, de l'ordre de 18 m³/s, sont certes beaucoup moins importants que ceux des 5 tranches, mais il semblerait que le passage par la pisciculture entraîne une diversification des espèces.

De plus, on peut recenser dans le secteur de nombreuses industries dont les rejets sont déversés en mer. Il ne s'agit pas forcément d'eaux chaudes, mais de par les teneurs parfois élevées en matière organique et matières en suspension, cela peut contribuer à l'augmentation des concentrations en vibrions. Une liste (non exhaustive) des industries rejetant en mer de fortes quantités de DCO, DBO, azote et phosphore figure en Annexe 5.

L'étude de la carte IGN du site, les recherches sur internet et les contacts avec divers organismes (DDASS, DRAM, Ifremer) ont dans un premier temps permis de recenser les activités aux abords de la centrale. La visite sur site a ensuite permis d'y ajouter quelques précisions.

Concernant les activités de pêche, il faut savoir que la pêche professionnelle est interdite dans le département du Nord. La pêche de loisir y est par contre autorisée sur l'estran. Il n'y a aucune exploitation conchylicole, mais un projet est en cours au large de Zuydcoote, donc bien au-delà du CNPE. Dans le Pas de Calais, à l'ouest du site, des exploitations de **moules sur bouchots sont en place sur Oye plage et Marck plage**, mais la plupart des exploitations conchylicoles de la région Nord-Pas de Calais se situent dans la Somme. On retrouve des **gisements naturels pour la pêche à pied** : gisements de moules au niveau des jetées, sur Loon plage et au large de Zuydcoote, gisements de coques (non permanents) sur Oye plage et Marck plage. Dans les zones portuaires, la pêche à pied est normalement interdite.

La **zone de baignade** la plus proche du site est celle de Petit-Fort-Philippe. Elle s'étend de la digue de l'Aa jusqu'au canal de rejet de la centrale. Toutefois, au niveau du CNPE, la baignade n'est pas surveillée, et d'après les personnes rencontrées sur place, elle n'y serait pas pratiquée. Cette zone attire cependant de nombreux pêcheurs.

De l'autre côté de la rive, les abords du canal de rejet sont interdits au public, ce qui est bien signalé par un grillage et des panneaux. Toutefois, au cours de la visite, nous avons pu y voir des **pêcheurs**. Ceux-ci sont aussi très nombreux à pêcher dans le canal d'amenée. Le secteur semble très réputé pour la pêche de bars. D'après les résidents locaux, les quantités pêchées seraient supérieures aux quantités nécessaires pour une simple consommation personnelle.

Enfin, comme évoqué ci-dessus, une **ferme aquacole** est en place aux abords de la centrale. Elle produit aujourd'hui 2 500 tonnes de bars et de dorades. 50 % de la production sont exportés, 40 % sont vendus à un grossiste, et les 10 % restant sont vendus aux restaurants locaux.

2.1.3 Définition de la zone d'étude

Pour établir un premier périmètre d'étude autour du site, l'utilisation de thermographies du panache de rejet peut être utile. Ces thermographies permettent de connaître la zone d'influence thermique des rejets de la centrale. Ces données sont intéressantes puisque la prolifération des vibrions est directement liée à la température. Ainsi, lorsque les rejets de la centrale n'ont plus d'influence sur la température de l'eau, les quantités de vibrions sont nettement plus faibles. Il faut penser à tenir compte des marées, car selon le sens du courant, le rejet n'a pas le même comportement.

Il est aussi important de tenir compte des activités existantes autour du site, et de ne pas se limiter à la seule zone d'influence thermique. Ainsi, si des activités à risque se trouvent un peu plus loin que le périmètre d'étude défini par la température, il peut être pertinent d'étendre ce périmètre.

La thermographie réalisée sur le site de Gravelines en marée descendante (jusant) est présentée en Annexe 6. On dispose également de « courbes d'iso concentration » en vibrions, à marée montante et à marée descendante (Annexe 6 également). Couplé à la thermographie, cela permet d'avoir une idée de l'impact du panache.

Compte tenu des activités recensées dans le paragraphe précédent et des documents évoqués ci-dessus, la zone d'étude retenue est présentée en Annexe 4. Les principales activités de cette zone sont localisées sur la carte suivante.

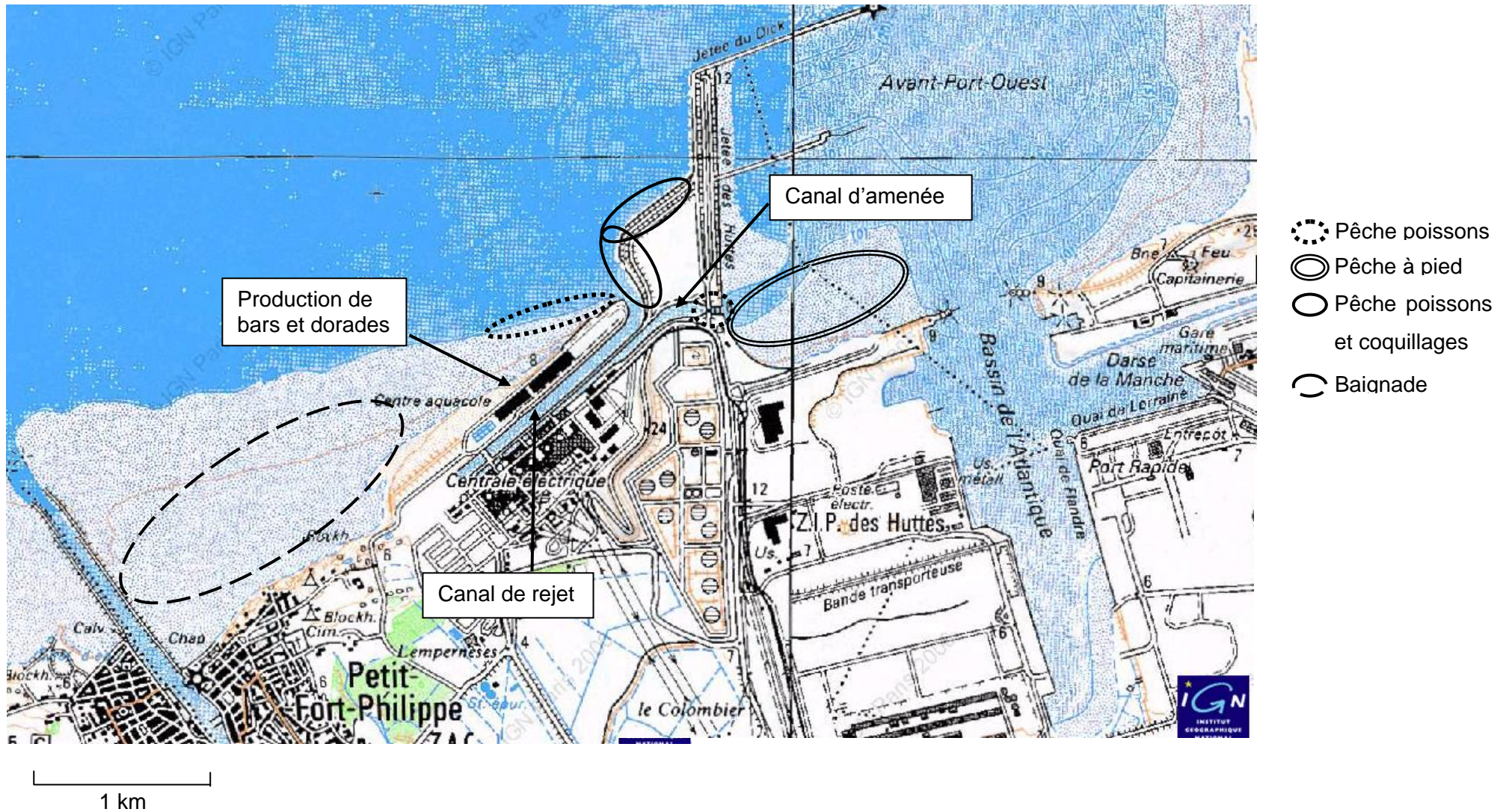


Figure 1 : Localisation des principales activités à proximité du site

2.2 Identification des dangers

L'agent pathogène étudié dans ce rapport est le vibron non cholérique. Toutefois, les onze espèces supposées pathogènes pour l'homme n'entraînent pas un même danger ; il a donc paru pertinent de **sélectionner les espèces d'intérêt sanitaire**. Pour cela, des critères de sélection ont été établis. Des recherches documentaires dans la bibliographie française et internationale et un contact avec J.M. Fournier, du Centre National de Référence (CNR) des vibrions et du choléra ont permis de renseigner ces critères. Les critères étudiés sont les suivants :

- pathogénicité avérée chez l'homme ;
- gravité des infections occasionnées (ce critère tient également compte de la facilité de traitement associé) : Pour cela, un tableau présentant les différentes formes cliniques attribuables à chaque espèce, ainsi que leur fréquence, a été dressé (Annexe 3) ;
- fréquence des infections en France ;
- fréquence des infections aux Etats-Unis : il a semblé pertinent de retenir ce critère car les Etats-Unis disposent d'un système de surveillance en place depuis plus longtemps que le système français, avec un nombre de cas beaucoup plus conséquent. Ceci permet donc d'avoir un recul plus important.

Les données utilisées concernant la fréquence des infections à vibrions non cholériques en France sont celles du CNR. L'unité de lutte contre le choléra de l'Institut Pasteur de Paris a été désignée par le ministère de la Santé comme Centre National de Référence des vibrions et du choléra. Initialement, le CNR travaillait sur les vibrions cholériques. Toutefois, compte tenu du développement des cas à vibrions non cholériques et dans une approche globale visant à évaluer l'impact des vibrions sur la santé publique, il étudie également aujourd'hui les vibrions non cholériques. Il reçoit les souches isolées par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses biologiques et médicales pour identification ou confirmation d'identification. L'exhaustivité des données n'est pas connue. Toutefois, après avoir recensé plusieurs sources de données, une étude de l'InVS a conclu que pour les formes graves hospitalisées, la représentativité du CNR est bonne. Il est en revanche très probable que les formes bénignes soient sous-diagnostiquées du fait de leur caractère auto-limité. De plus, pour les gastro-entérites, la mise en évidence d'un vibron dans les selles nécessite l'utilisation d'un milieu sélectif non utilisé en routine (InVS, 2004). Enfin, d'après l'entretien téléphonique avec Jean-Michel Fournier du CNR, l'augmentation du coût d'expédition des souches l'amène à penser que le CNR recevra de moins en moins de souches à l'avenir.

Les données américaines proviennent des Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Il s'agit d'une agence du gouvernement américain, chargée de la prévention, de l'étude et du contrôle des maladies. Dans ce cadre, elle produit chaque année un rapport sur les cas d'infections à vibrions aux Etats-Unis. Il faut noter que les CDC connaissent pour les vibrions le même problème d'exhaustivité que le CNR. Une étude conduite en 1999 a en effet permis d'estimer que les vibrions seraient à l'origine de 7 880 cas par an, alors que 505 cas seulement seraient rapportés aux systèmes de surveillance (Mead *et al.*, 1999).

Pour sélectionner les espèces, une deuxième approche a été effectuée, au niveau local, pour tenir compte de la spécificité du site étudié. Deux critères supplémentaires ont été retenus, et peuvent être renseignés grâce à l'exploitation des données de surveillance sur le site d'étude (résultats des campagnes de mesures EDF). Il s'agit de la fréquence d'isolement et de l'abondance de chaque espèce de vibrions sur le site en question. En effet, il serait par exemple inutile pour l'évaluation des risques de retenir une espèce jamais isolée sur le site. Ces critères doivent toutefois être considérés avec prudence, puisque la qualité des mesures n'est pas la même d'un site à l'autre.

Le tableau suivant récapitule les six critères proposés, appliqués au site des Gravelines. Il faut toutefois noter que les données fournies pour les critères généraux sont bien entendu réutilisables quel que soit le site d'étude.

Tableau 4 : Critères de sélection des espèces de vibrions non cholériques

(USFDA, 1992; CDC, 1999b; Powell, 1999; CDC, 2000; Geneste *et al.*, 2000; Strom *et al.*, 2000; CDC, 2001; European Commission, 2001; CDC, 2002; Fournier *et al.*, 2002; Miossec, 2002; CDC, 2003; Quilici *et al.*, 2003; CDC, 2005a; CDC, 2005b; Quilici *et al.*, 2005a)

	Pathogénicité établie	Gravité de l'infection	Fréquence de l'infection		Fréquence d'isolement	Abondance
			France	USA	<i>spécifiques Gravelines</i>	
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	oui	+++	+++	++	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	oui	++	++	+++	++	+
<i>V. vulnificus</i>	oui	+++	++	+++	+	+
<i>V. fluvialis</i>	oui	+	+	+	++	+
<i>V. alginolyticus</i>	oui	+	++	++	+++	+++
<i>V. damsela</i>	?	?	-	(+)	+	+
<i>V. furnissii</i>	oui	+	-	(+)		
<i>V. hollisae</i>	oui	++	+	(+)	+	+
<i>V. mimicus</i>	oui	+	-	(+)	++	+
<i>V. metschnikovii</i>	?	?	-	(+)	+	+
<i>V. cincinnatiensis</i>	?	?	-	(+)		
<i>V. carchariae</i>	oui	+++	-	(+)		

+++ : propriété très importante ; ++ : propriété importante ; + : propriété présente ; (+) : propriété peu importante ; - : propriété absente ; ? : propriété mal connue

La première approche utilisée a permis de dégager trois espèces à retenir pour une évaluation des risques, à savoir : ***V. cholerae non-O1/non-O139***, ***V. parahaemolyticus*** et ***V. vulnificus***. Au vu des deux critères supplémentaires étudiés et spécifiques au site, la question se pose de savoir s'il est justifié ou non d'ajouter à ces espèces *V. alginolyticus*. En effet, cette espèce est la plus fréquemment isolée sur le site, et à des concentrations beaucoup plus élevées. Toutefois, seule l'exposition par contact est susceptible de provoquer une infection par cette espèce. Or, comme nous le verrons ci-après, il s'agit de la voie la moins étudiée, et les publications sont de ce fait très limitées. Les données nécessaires à une évaluation des risques ne sont donc pas disponibles. Il apparaît de plus, d'après la bibliographie, que la plupart des infections à *V. alginolyticus* se soignent très facilement et ne requièrent que rarement la consultation d'un spécialiste. Cette espèce n'a donc pas été retenue.

2.3 Caractérisation des dangers

L'objectif de cette étape est de caractériser les dangers associés à chaque espèce retenue dans la partie précédente. Pour cela, une étude plus poussée de la bibliographie a été réalisée, permettant pour chaque espèce de dégager les caractéristiques épidémiologiques, les facteurs de virulence, la relation dose-réponse et les conditions de croissance dans l'environnement.

Même si la bibliographie internationale a été consultée, la plupart des données présentées ici sont des données américaines, les études étant beaucoup plus nombreuses. Il faut noter aussi que pour toutes les espèces, les infections d'origine alimentaire sont les mieux connues et donc les plus documentées.

Parmi les infections à vibrions en France, 45, 14 et 13 % sont respectivement dues à *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Aux Etats-Unis, 12 % sont dues à

V. cholerae, 36 % à *V. parahaemolyticus* et 25 % à *V. vulnificus*. Dans les deux cas, ces espèces représentent donc presque 3/4 des infections à vibrions.

2.3.1 *Vibrio cholerae*

On distingue plus de 200 sérogroupes pour cette espèce (Theophilo *et al.*, 2006). Toutefois, seuls les sérogroupes O1 et O139 sont à l'origine du choléra. Ils ne sont pas étudiés dans ce rapport.

A) Epidémiologie

➤ Formes cliniques et symptômes

Les formes cliniques associées à une infection à *V. cholerae* sont diverses (Tableau 5). On distingue, par ordre décroissant de fréquence, les gastro-entérites, les septicémies, les infections de plaies, et les otites.

Tableau 5 : Fréquence des formes cliniques associées à *V. cholerae* en France et aux Etats-Unis

	France ⁽¹⁾ 1995-2003	Floride ⁽²⁾ 1981-1993	Etats-Unis ⁽³⁾ 1997-2004
Gastro-entérite	36 %	67 %	63 %
Septicémie	38 %	15 %	15 %
Infection de plaie	18 %	8 %	7 %
Otite	8 %	< 1%	16 %
Autre	-	9 %	
Nombre total de cas	43	130	362

Sources : ⁽¹⁾ (Geneste *et al.*, 2000; Quilici *et al.*, 2003; Quilici *et al.*, 2005a)

⁽²⁾ (Powell, 1999)

⁽³⁾ (CDC, 1999b; CDC, 2001; CDC, 2002; CDC, 2003; CDC, 2005a; CDC, 2005b)

Les gastro-entérites sont les formes les plus fréquemment rapportées dans la littérature. La gravité est variable d'un cas à l'autre. Les symptômes incluent diarrhée (rarement sanglante selon la plupart des sources ; les études américaines donnent toutefois une fréquence de 25 %), crampes abdominales, fièvre avec parfois nausées et vomissements (25 % des cas). La période d'incubation est assez courte, puisqu'elle est inférieure à 48 heures (Morris *et al.*, 1990; USFDA, 1992; Morris, 2003), et la durée moyenne des symptômes est de 1 à 2 jours (Morris *et al.*, 1990; Miossec, 2002) mais peut s'étendre jusqu'à 7 jours pour les cas les plus sévères rapportés par les études américaines (USFDA, 1992). La maladie est généralement bénigne et auto-limitée.

Les septicémies apparaissent principalement chez les personnes immunodéprimées. Ces infections sont beaucoup plus graves, et ont un taux de mortalité compris entre 25 et 61 % (Morris, 2003; Lukinmaa *et al.*, 2006). Elles sont notamment caractérisées par de la fièvre, des frissons et de l'hypotension (USFDA, 1992).

Les infections de plaie sont caractérisées par des rougeurs et enflures au niveau du site d'infection.

Les cas d'infections de l'oreille sont plus rares. Quelques cas isolés d'infections pulmonaires ou urinaires et d'altérations du système nerveux central ont également été décrits (Powell, 1999; Anderson *et al.*, 2004).

On constate, d'après les données de surveillance en France (Tableau 5), que *V. cholerae* est à l'origine d'autant de septicémies que de gastro-entérites, contrairement

à ce que rapporte la littérature internationale. Ceci peut être dû à une sous-déclaration de cas, puisque les patients atteints d'une gastro-entérite ne consultent pas toujours un médecin, et l'envoi des souches cliniques au CNR est donc plus rare.

➤ Mode de contamination

Aux Etats-Unis, presque tous les cas de gastro-entérites ont été associés à l'ingestion d'huîtres crues. D'après une étude de surveillance menée en 1993 dans les états bordant le Golfe du Mexique, 42 % (10/24) des patients atteints d'une gastro-entérite ou d'une septicémie primaire due à *V. cholerae* non-O1/non-O139 avaient ingéré des huîtres seulement, et pas d'autres produits de la mer, durant la semaine précédant leur maladie (Anderson *et al.*, 2004). Dans les autres pays, la plupart des cas rapportés sont liés à l'ingestion de produits de la mer (poissons insuffisamment cuits, coquillages, crustacés).

Les infections de plaie sont dues à un contact avec la mer ou ses produits (poissons, coquillages...). Il s'agit soit d'une infection de plaie préexistante, soit d'une infection contractée lors d'une nouvelle blessure suite à un contact avec la mer ou ses produits (par exemple, lors de l'ouverture d'huîtres).

Les septicémies ont deux origines possibles. On parle de septicémie primaire lorsque l'infection est contractée à la suite d'ingestion de produits de la mer. Dans ce cas, la septicémie peut s'accompagner d'une gastro-entérite. On parle plutôt de septicémie secondaire lorsqu'une infection de plaie dégénère en septicémie.

➤ Population sensible

Toute la population est susceptible de développer une gastro-entérite ou une infection de plaie suite à un contact avec *V. cholerae*. Toutefois, on ne retrouve les septicémies que chez les personnes immunodéprimées, en particulier les personnes atteintes d'une cirrhose du foie ou d'une hémopathie maligne, pour lesquelles l'issue est souvent fatale (Morris, 2003; Ou *et al.*, 2003).

B) Facteurs de virulence

➤ Toxines

En général, ces souches n'ont pas les gènes codant pour les toxines cholériques, que l'on retrouve chez les souches O1 et O139. Il semblerait en effet que moins de 5 % des souches appartenant aux sérotypes non-O1/non-O139 aient la capacité de produire cette entérotoxine (contre plus de 95 % pour O1 et O139) (Theophilo *et al.*, 2006). Toutefois, l'étude de souches cliniques a mis en évidence la production d'autres toxines. Ces toxines ne sont pas spécifiques des sérogroupes non-O1/non-O139, puisque beaucoup d'entre elles ont déjà été caractérisées chez *V. cholerae* O1 ou chez d'autres espèces de vibriens.

La plupart des souches produisent une protéine cytotoxique identique à l'hémolysine El Tor, que l'on retrouve chez *V. cholerae* O1, qui serait à l'origine des symptômes diarrhéiques. Quelques souches possèdent les gènes de la toxine cholérique, de la toxine Zonula Occludens (Zot) et de l'entérotoxine cholérique accessoire (Ace), également retrouvées chez *V. cholerae* O1. Enfin, on a parfois retrouvé une entérotoxine thermostable (NAG-ST), assez similaire à l'entérotoxine STa d'*E. coli* (Powell, 1999; Lesne *et al.*, 2005; Theophilo *et al.*, 2006), et le gène codant pour l'hémolysine directe thermostable de *V. parahaemolyticus*.

➤ Capsule

La plupart des souches (70 à plus de 90 % selon les études) ont une capsule polysaccharidique (Morris, 2003; Lesne *et al.*, 2005). Cette capsule leur permet d'une part de mieux survivre dans l'environnement et d'autre part de se protéger contre le système immunitaire de leur hôte (Powell, 1999). Elle augmente en effet la capacité des bactéries à résister à la phagocytose et à entraîner des septicémies chez les sujets immunodéprimés (Lesne *et al.*, 2005).

C) Dose infectieuse – relation dose-réponse

➤ Exposition par ingestion

Une étude sur 27 volontaires humains a été réalisée en 1990 par Morris. Il a observé 3 souches de *V. cholerae* non-O1, en faisant varier les doses administrées de 10^5 à 10^9 UFC. Seule la souche produisant la toxine NAG-ST et capable de coloniser le tractus gastro-intestinal a provoqué une diarrhée chez 6 volontaires sur 10. La dose minimale pour laquelle les symptômes sont apparus était de 10^6 UFC (Morris *et al.*, 1990).

Aucune relation dose-réponse complète n'a été élaborée pour l'instant.

➤ Exposition par contact

Aucune donnée sur l'homme n'est disponible, et très peu le sont chez l'animal. Comme les expositions se font par contact avec une plaie pré-existante, les études se rapprochant le plus de ce type d'exposition sont celles où sont réalisées des injections sous-cutanées. Une telle étude a été réalisée par Simpson *et al.* (1987) sur 72 souris. Douze souches de *V. cholerae* non-O1 ont été testées. Une dose de 10^7 cellules a été injecté par voie sous-cutanée. Neuf des souches ont entraîné des oedèmes et lésions et le taux de mortalité a été supérieur à 50 % pour 7 d'entre elles.

D) Conditions de croissance

V. cholerae supporte des températures comprises entre 10 et 43 °C (Price *et al.*, 2003), mais sa multiplication est favorisée lorsque la température de l'eau dépasse 20 °C. Il n'est pas détectable pendant les mois froids quand la température de l'eau descend en-dessous de 11 °C, mais survit sous une forme viable non cultivable.

Par rapport aux autres vibrions non cholériques, il a la particularité d'avoir été isolé en eau douce (salinité comprise entre 0,4 et 2,6 g/L) comme en milieu marin (salinité comprise entre 19 et 33 g/L) (Venkateswaran *et al.*, 1989). D'après la campagne de mesures EDF réalisée en 2001 sur le site du CNPE du Blayais, on retrouvait des *V. cholerae* pour des salinités comprises entre 2 et 22 g/L, avec une abondance beaucoup plus importante entre 2 et 6 g/L.

Enfin, le pH doit être compris entre 5 et 10 (Price *et al.*, 2003).

2.3.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Il s'agit de l'espèce la plus souvent isolée chez les humains aux Etats-Unis (Daniels *et al.*, 2000).

A) Epidémiologie

➤ Formes cliniques et symptômes

Depuis 1996, l'incidence des infections à *V. parahaemolyticus* a fortement augmenté. Si les cas précédents d'infections étaient le plus souvent sporadiques, de nombreuses toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont apparues. Cette augmentation semble reliée à l'émergence d'un nouveau clone, appartenant au sérovar O3:K6 (Quilici *et al.*, 2005b).

Plusieurs formes cliniques sont observables, mais la forme prédominante est la gastro-entérite. Les autres formes sont les suivantes : infections de plaie, septicémie, otite (Tableau 6). Quelques cas d'infections oculaires et urinaires et de péritonites ont également été rapportés, mais sont plus rares. 94 % des cas sporadiques (toutes formes) surviennent entre Avril et Octobre ; il en est de même pour 80 % des TIAC (Daniels *et al.*, 2000).

Tableau 6 : Fréquence des formes cliniques associées à *V. parahaemolyticus* en France et aux Etats-Unis

	France ⁽¹⁾ 1995-2003	Floride ⁽²⁾ 1981-1993	Etats-Unis ⁽³⁾ 1997-2004
Gastro-entérite	85 %	58 %	83 %
Infection de plaie	-	27 %	8 %
Septicémie	15 %	8 %	2 %
Autre	-	7 %	7 %
Nombre total de cas	13	206	1496

Sources : ⁽¹⁾ (Geneste *et al.*, 2000; Quilici *et al.*, 2003; Quilici *et al.*, 2005a)

⁽²⁾ (Powell, 1999)

⁽³⁾ (CDC, 1999b; CDC, 2001; CDC, 2002; CDC, 2003; CDC, 2005a; CDC, 2005b)

Une étude réalisée entre 1973 et 1998 dans quatre états américains (Floride, Alabama, Louisiane, Texas) à partir des données des CDC a permis d'estimer la fréquence des différents symptômes, ainsi que les taux d'hospitalisation et de mortalité. Les résultats de l'étude sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 7 : Caractéristiques des infections à *V. parahaemolyticus*

		Gastro-entérite	Infection de plaie	Septicémie
Nombre de cas		202	118	17
Symptômes	Diarrhée	98 %	7 %	65 %
	Diarrhée sanglante	29 %	-	40 %
	Douleurs abdominales	89 %	8 %	71 %
	Nausées	76 %	20 %	75 %
	Vomissements	55 %	6 %	63 %
	Fièvre	52 %	49 %	93 %
	Cellulite localisée	-	83 %	20 %
Lésions bulleuses	-	11 %	8 %	
Taux d'hospitalisation		38 %	61 %	82 %
Taux de mortalité		2 %	3 %	29 %

Durant cette même période, 40 cas de TIAC ont été rapportés, ce qui a permis d'obtenir les informations suivantes. Le taux d'attaque médian est de 56 %, la période d'incubation médiane de 17 h (4 à 90 h), et la durée moyenne de la maladie de 2.4 j (8 h à 12 j). Le nombre médian de personnes impliquées dans ces TIAC est de 5 (2 à 296) (Daniels *et al.*, 2000). *V. parahaemolyticus* est la cause la plus fréquente de gastro-entérites aux Etats-Unis.

➤ Modes de contamination

Les gastro-entérites sont presque exclusivement associées à l'ingestion de produits de la mer consommés crus ou mal cuits (ou re-contaminés après la cuisson). Entre 1973 et 1996 aux Etats-Unis, parmi 42 TIAC à *V. parahaemolyticus*, 33 ont fait suite à la consommation de coquillages (Fournier *et al.*, 2002). Entre 1973 et 1998 dans les 4 états bordant le golfe du Mexique, parmi 40 TIAC, 14 ont été dues à l'ingestion d'huîtres. Il est intéressant de noter que dans 38 % des cas seulement, on a la certitude que les produits de la mer ont été mangés crus. Avant 1997, les aliments les plus couramment associés à des infections étaient les crabes, les huîtres, les crevettes et les homards. En France, une épidémie survenue en 1997 (44 patients) a été attribuée à la consommation de crevettes (Robert-Pillot *et al.*, 2004). Au Japon, la plupart des TIAC sont dues à la consommation de poissons, du fait de leur mode de préparation (Daniels *et al.*, 2000; FAO, 2002).

Les infections de plaie sont dues à un contact avec la mer ou ses produits (poissons, coquillages...). Il s'agit soit d'une infection de plaie préexistante, soit d'une infection contractée lors d'une nouvelle blessure suite à un contact avec la mer ou ses produits. Ces infections peuvent parfois dégénérer en septicémie.

➤ Population sensible

Tous les individus sont susceptibles de développer une infection. Toutefois, la présence de pathologies sous-jacentes est un facteur de risque important, notamment pour les septicémies. Ainsi, selon les données des CDC, une pathologie était présente pour 29 %, 41 % et 71 % des patients ayant développé respectivement une gastro-entérite, une infection de plaie ou une septicémie. Les pathologies les plus fréquemment rencontrées sont les maladies du foie, l'alcoolisme ou le diabète (Daniels *et al.*, 2000).

Dans le cas des infections de plaies, 84 % des patients étaient des hommes (Daniels *et al.*, 2000). On peut penser que beaucoup de blessures peuvent survenir dans le cadre d'une exposition professionnelle (écaillers notamment), qui concerne des postes plutôt masculins. Ceci ne serait donc pas obligatoirement dû à une sensibilité plus élevée.

B) Facteurs de virulence

Au moins 4 composants hémolytiques existent chez *V. parahaemolyticus* : une hémolysine directe thermostable (TDH), une hémolysine apparentée à la TDH (TRH), une phospholipase A et une lysophospholipase. Deux d'entre elles, la TDH et la TRH sont fortement corrélées à la pathogénicité.

Depuis les années 50, le lien a été établi entre la virulence pour l'homme d'un isolat de *V. parahaemolyticus* et sa capacité à produire une hémolyse β sur gélose au sang (phénomène de Kanawaga). Au Japon, il a été observé que 96.5 % de 2 720 souches cliniques humaines étaient positives (souches K+) contre seulement 1 % de 650 souches environnementales (souches K-). Une sélection naturelle des souches K+ dans le tractus intestinal et une meilleure survie des souches K- dans les écosystèmes estuariens pourraient expliquer ces résultats. Toutefois, plusieurs études suggèrent que les méthodes de culture pourraient favoriser l'isolement des souches K- ou que des états physiologiques différents ou non cultivables pourraient exister dans les environnements estuariens.

Pendant longtemps, on a estimé que le pouvoir pathogène était lié aux souches K+. Ces souches produisent la **TDH**, codée par les gènes *tdh*. Administrée à des cobayes à la dose de 2.5 μ g, elle augmente la vasoperméabilité et provoque un œdème, un érythème et une induration de la peau. L'administration de la toxine par voie orale à des souriceaux nouveau-nés provoque une diarrhée, voire la mort des animaux lorsque la quantité ingérée est d'environ 50 μ g.

A partir du milieu des années 1980, des souches K⁻ ont été isolées de cas de gastro-entérites. Elles synthétisent la **TRH**, codée par les gènes *trh*. Cette toxine pourrait être un facteur de virulence important, qui expliquerait la survenue de diarrhées chez des patients dont les selles ne renferment que des souches K⁻.

En général, une souche ne produit qu'une seule de ces deux hémolysines.

Les souches responsables des pandémies (clone O3:K6 et autres clones dérivant de ce dernier) possèdent le gène *tdh*, mais sont dépourvues du gène *trh*. Ces clones ne produisent pas plus de toxines que les souches normales, mais hébergent un phage filamenteux, qui produit une protéine favorisant l'adhésion aux cellules et responsable d'un pouvoir cytotoxique élevé (European Commission, 2001; Euzéby, 2005; Lesne *et al.*, 2005).

La connaissance de ces deux facteurs n'exclut pas l'existence d'autres facteurs de virulence. Par exemple, les souches de *V. parahaemolyticus* synthétisent un sidérophore, la vibrioferrine, capable de séquestrer le fer lié à la transferrine humaine. Toutefois, son rôle dans la pathogénèse n'a pas encore été établi. Il en est de même pour certains facteurs d'adhésion aux cellules (European Commission, 2001).

C) Dose infectieuse – relation dose-réponse

Le lien entre la toxine TRH et la virulence ayant été établi plus récemment, les études sur les volontaires humains ne portent que sur les souches produisant la TDH. Quatre études assez anciennes peuvent être répertoriées (USFDA, 2005) :

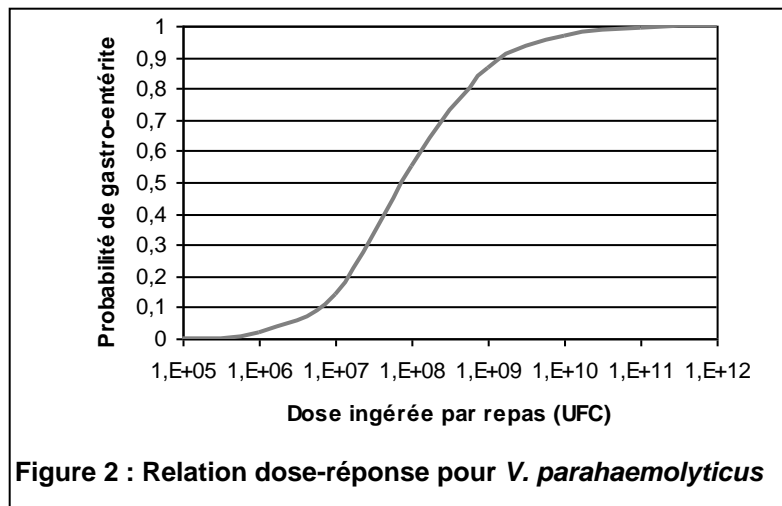
- Takikawa (1958) a montré que l'ingestion de 10^6 cellules d'une souche K+ entraîne une diarrhée chez l'un des deux volontaires. A partir de 10^7 cellules, les deux volontaires sont malades.
- Aiso et Fujiwara (1963) ont étudié 3 isolats cliniques (2K- et 1K+) et un isolat de coquillage (K-). Les souches ont été incorporées à du lait et ingérées juste avant la prise d'un repas normal. Seule la souche K+ a entraîné une gastro-entérite chez les 4 patients, à la dose de 10^9 .
- Sakazaki et al (1968) ont montré que 15 souches K- (isolées de poissons) ne produisaient pas de maladie à une dose aussi élevée que 10^9 cellules.
- Sanyal et Sen (1974) ont montré que l'ingestion d'une faible dose (200 UFC) d'une souche K+ ne provoque pas de symptômes. Une gêne abdominale est observée pour un volontaire sur 4 à la dose de 2.10^5 UFC, et 2 volontaires sur 4 ont eu gêne abdominale et diarrhée à la dose de 3.10^7 UFC. A l'inverse, les volontaires ayant reçu jusqu'à 2.10^{10} UFC d'une souche K- ne présentaient pas de diarrhée.

Ces études comportent toutefois certaines limites. Tout d'abord, les doses testées sont assez élevées, et ne donnent donc aucune information sur l'effet des faibles doses (comme dans la majeure partie des études expérimentales). Pour la plupart des études (excepté celle de Aiso et Fujiwara), l'ingestion des microorganismes n'a pas été réalisée grâce à une matrice alimentaire. Ceci pose un problème car la matrice alimentaire a un rôle sur l'acidité de l'estomac, et donc sur la dose minimale infectieuse (*V. parahaemolyticus* est sensible à l'acidité). Enfin, un nombre très restreint de volontaires est étudié, et leurs caractéristiques ne sont pas toujours connues (sexe, âge, état de santé).

D'autre part, des épidémies récentes liées à la consommation d'huîtres et autres mollusques bivalves laissent penser qu'une dose beaucoup plus faible pourrait être à l'origine des gastro-entérites. En effet, des mesures sur les sites de récolte impliqués ont révélé des concentrations inférieures à 200 UFC/g de chair (CDC, 1998; CDC, 1999a).

Toutes les études sont antérieures à 1974, et il est très peu probable que de nouveaux essais soient menés sur les humains car des études sur des modèles animaux ont montré une apparente cardiotoxicité de la TDH (USFDA, 2005).

Dans son étude sur l'évaluation des risques liés à *V. parahaemolyticus* dans les huîtres, la FDA propose un modèle pour définir l'ensemble de la courbe de la relation dose-réponse. Le modèle est déterminé à l'aide d'une loi statistique qui caractérise la probabilité d'infection en fonction de l'exposition au pathogène. A partir de 3 des études citées précédemment et de données épidémiologiques, la FDA a ainsi élaboré une relation dose-réponse, basée sur une loi Bêta-Poisson. Pour tenir compte des incertitudes, elle propose une famille de courbes dose-réponse. Les équations et l'ensemble des courbes sont présentés en Annexe 7. La figure suivante représente la courbe dose-réponse la plus probable. Elle modélise le risque de contracter une gastro-entérite en fonction de la quantité de vibrions ingérée par repas, pour la population générale.



Il faut noter que la courbe proposée comporte des incertitudes. En effet, elle est basée sur des études sur des volontaires humains, elles-mêmes incertaines (cf ci-dessus). De plus, aucune étude n'a permis d'évaluer les expositions à faible dose et le seul facteur de pathogénicité considéré est la toxine TDH.

Il s'agit de la seule relation dose-réponse actuellement disponible (utilisée aussi par l'OMS).

Pour l'exposition par contact, aucune donnée n'a été trouvée.

D) Conditions de croissance

V. parahaemolyticus supporterait des températures comprises entre 5 et 43 °C. Sa concentration est très faible entre 10-14 °C (forme viable non cultivable) ; elle augmente avec l'accroissement de température, la multiplication étant favorisée lorsque la température dépasse 20 °C (Kaneko *et al.*, 1973; Price *et al.*, 2003).

V. parahaemolyticus vit majoritairement dans des eaux à salinité modérée (comprise entre 15 et 25 g/L) (Euzéby, 2005). La campagne EDF sur le site du Blayais a montré qu'on le retrouve pour des salinités comprises entre 1,5 et 34 g/L, mais son abondance est plus élevée entre 2 et 8 g/L.

Le pH doit être compris entre 4,8 et 11 (Price *et al.*, 2003).

2.3.3 *Vibrio vulnificus*

Le nombre de personnes infectées par *V. vulnificus* est faible par rapport aux autres espèces (environ 50 cas/an aux Etats-Unis). Toutefois, la gravité des symptômes en fait aux Etats-Unis la cause majeure de décès associés aux produits de la mer (Strom *et al.*, 2000). Trois biotypes sont aujourd'hui connus. Le biotype 1 est celui le plus souvent retrouvé chez l'homme. Le biotype 2 a été initialement décrit comme pathogène pour les anguilles d'élevage. Toutefois, on sait aujourd'hui qu'il est aussi pathogène pour les humains. Enfin, le biotype 3 a été décrit plus récemment (1999). Comme le biotype 1, il est uniquement pathogène pour l'homme (tous les cas font suite à la manipulation de tilapias d'élevage).

A) Epidémiologie

➤ Formes cliniques et symptômes

Les formes cliniques sont assez variées (Tableau 8), mais les deux principales sont la septicémie et l'infection de plaie. Plus rarement, des cas de pneumonies, otites ou endométrites ont été rapportés. *V. vulnificus* serait aussi à l'origine de gastro-entérites. Toutefois, l'association entre les deux reste peu claire : en effet, pour les cas de gastro-entérites rapportés, la recherche d'autres germes que *V. vulnificus* n'a pas été réalisée (Strom *et al.*, 2000).

Tableau 8 : Fréquence des formes cliniques associées à *V. vulnificus* en France et aux Etats-Unis

	France ⁽¹⁾ 1995-2003	Floride ⁽²⁾ 1981-1993	Etats-Unis ⁽³⁾ 1997-2004
Septicémie	92 %	53 %	57 %
Infection de plaie	8 %	33 %	33 %
Gastro-entérite	-	11 %	4 %
Autre	-	3 %	6 %
Nombre total de cas	12	141	671

Sources : ⁽¹⁾ (Geneste *et al.*, 2000; Quilici *et al.*, 2003; Quilici *et al.*, 2005a)

⁽²⁾ (Powell, 1999)

⁽³⁾ (CDC, 1999b; CDC, 2001; CDC, 2002; CDC, 2003; CDC, 2005a; CDC, 2005b)

Les symptômes rapportés lors des septicémies sont divers. On observe en général l'apparition soudaine de fièvre (94 %) et de frissons (86 %), souvent accompagnés de vomissements, diarrhée, douleurs abdominales et douleurs dans les extrémités des membres. Un jour après l'apparition des premiers symptômes, des lésions cutanées secondaires (cellulite, bulle, ecchymose...) apparaissent aux extrémités chez 69 % des patients. De 40 à plus de 60 % souffrent de choc septique, avec une pression systolique inférieure à 90 mm Hg. Dans les 7 jours apparaissent des troubles mentaux chez la moitié des patients. Dans la plupart des cas, *V. vulnificus* est isolé du sang et de lésions cutanées. Ces lésions deviennent nécrotiques et requièrent une intervention chirurgicale (débridement, voire amputation). Le taux de mortalité est de 60 à 75 % (Linkous *et al.*, 1999; Strom *et al.*, 2000).

Pour les infections de plaie, les symptômes sont proches de ceux décrits précédemment, mais différent par leur gravité. On observe une inflammation à l'endroit de la blessure qui peut dégénérer en cellulite (88 %) ou en nécrose (là aussi, une intervention chirurgicale peut s'avérer nécessaire). Souvent, ces patients deviennent septicémiques, et souffrent de fièvre (69 %), frissons (29 %), troubles mentaux (18 %) et hypotension (12 %). On observe très rarement des symptômes gastro-intestinaux (6 %). Le taux de mortalité est de 20 à 30 % (Linkous *et al.*, 1999; Strom *et al.*, 2000; Oliver, 2005). La période moyenne d'incubation est de 12 heures (European Commission, 2001). Un cas récent d'infection a montré que *V. vulnificus* peut survivre au moins 24 heures sur la peau (Colodner *et al.*, 2002).

La gravité des infections à *V. vulnificus* provient du fait qu'elles se développent très rapidement. Il est donc important de diagnostiquer la maladie le plus tôt possible, pour augmenter l'efficacité des traitements aux antibiotiques. Par exemple, sur les souris, Bowdre *et al.* (Bowdre *et al.*, 1981) ont montré que la tétracycline administrée 2 heures après une injection sous-cutanée de 10⁸ cellules de *V. vulnificus* évite la plupart des morts. En revanche, aucun des animaux ne survit si elle est administrée 3 heures après l'injection. Klontz *et al.* rapportent que sur 6 patients atteints d'une infection de plaie et soignés moins de 24 heures après le début de la maladie, seulement 2 sont décédés ; en revanche, tous les patients soignés dans un délai de plus de 72 heures sont décédés (Oliver, 2005).

➤ Modes de contamination

Presque tous les cas de septicémies et de gastro-entérites sont associés à la consommation de coquillages crus, principalement les huîtres. Strom rapporte que sur 181 cas de septicémies primaires, 173 patients avaient mangé des huîtres crues dans les 7 jours précédant l'apparition des symptômes. Les autres cas étaient liés à la consommation de clams crus ou de crevettes cuites. Dans les cas pour lesquels une

enquête a été réalisée, on a montré que 89 % des huîtres avaient été cultivées dans une eau dont la température dépassait 22 °C (Strom *et al.*, 2000).

Strom rapporte également que sur 189 cas d'infections de plaie entre 1988 et 1996, tous étaient dus à un contact avec la mer ou des poissons et coquillages dans les 7 jours précédant la maladie. La moitié des patients se sont blessés durant l'exposition, 21 % avaient une plaie préexistante, et 29 % ne se souvenaient pas du contexte d'apparition de la plaie. La plupart des cas d'infection ont fait suite à une exposition professionnelle (écailler, pêcheur).

➤ Population sensible

Les personnes les plus susceptibles sont celles souffrant de maladies chroniques affectant notamment le foie (cirrhose, alcoolisme, hépatite...mais aussi les personnes ayant un taux élevé en fer sérique) ou le système immunitaire (chimiothérapie, sida). Mais il peut aussi s'agir de diabète, de maladie rénale ou intestinale. D'après une étude réalisée dans le golfe du Mexique, 97 %, 68 % et 35 % des patients ayant développé respectivement une septicémie, une infection de plaie ou une gastro-entérite avaient une pathologie sous-jacente. Les maladies du foie sont le facteur de risque le plus fréquent (80 % des personnes ayant contracté une septicémie), mais également celui pour lequel le taux de mortalité est le plus élevé (Strom *et al.*, 2000). La plupart des septicémies (82 % selon Oliver) surviennent chez des hommes de plus de 50 ans. Ceci proviendrait de la différence de réponse induite par le LPS en fonction du sexe du patient (l'intensité de la réponse au LPS serait liée au taux d'oestrogènes) (Linkous *et al.*, 1999).

B) Facteurs de virulence

De nombreux facteurs de pathogénicité ont été décrits, mais ils n'expliquent ni la rapidité d'évolution de l'infection, ni les destructions tissulaires intenses observées. Ils sont identiques pour les biotypes 1 et 2, mais n'ont pas été étudiés pour le biotype 3 (Euzéby, 2005; Gulig *et al.*, 2005).

Compte tenu de la sévérité des effets engendrés par *V. vulnificus*, les facteurs de virulence sont étudiés sur des modèles animaux. Les facteurs suivants semblent être importants :

- La capsule polysaccharidique : elle est essentielle pour la capacité à initier une infection. La présence de cette capsule (colonies opaques) a été corrélée positivement à la virulence de la bactérie ; la perte de capsule chez des bactéries mutantes entraîne la perte de leur virulence. La capsule protégerait la bactérie de l'effet bactéricide du sérum et empêcherait la phagocytose.
- L'acquisition de fer : une teneur élevée en fer sérique est favorable au développement des septicémies. En effet, le fer est nécessaire à la multiplication de la bactérie : celle-ci produit ainsi des sidérophores lui permettant de capter le fer. Chez un individu ayant une teneur en fer sérique normale, les sidérophores entrent en compétition avec les protéines sériques de capture du fer (transferrines), limitant ainsi la multiplication de la bactérie et donc le risque d'infection. Chez les individus ayant une forte teneur en fer sérique, il n'y a plus d'effet de compétition, et la multiplication de la bactérie est donc facilitée.
- Les lipo-polysaccharides (LPS) : les symptômes survenant lors d'une septicémie à *V. vulnificus* sont classiquement associés à l'activité endotoxique des LPS. Ils seraient dus à la stimulation de l'oxyde nitrique par le LPS.
- Les flagelles : des bactéries mutantes incapables de synthétiser des flagelles se sont révélées moins virulentes chez la souris. Le flagelle facilite en effet l'adhésion aux cellules.
- Les protéines extra-cellulaires : *V. vulnificus* produit un grand nombre de composés extra-cellulaires, qui sont des facteurs de virulence potentiels. Toutefois, aucun d'entre eux n'a été clairement impliqué dans la pathogénèse. Certains, comme la chitinase, pourraient jouer un rôle dans la survie de la bactérie dans le milieu extérieur. D'autres, comme l'hémolysine, la métalloprotéase..., auraient un rôle sur le pouvoir pathogène.

Des études ont montré qu'il existe des souches virulentes et non virulentes. Toutefois, il semblerait que la plupart des souches soient virulentes, avec des degrés de virulence différents (Euzéby, 2005; Gulig *et al.*, 2005; Lesne *et al.*, 2005).

C) Dose infectieuse – relation dose-réponse

➤ Exposition par ingestion

La dose infectieuse de *V. vulnificus* est mal connue. Il semblerait que les infections apparaissent pour des doses supérieures à 10^3 bactéries/g d'huître (Jackson *et al.*, 1997), mais aucune étude sur des volontaires humains ne permet d'établir une relation dose-réponse.

La FAO et l'OMS (FAO *et al.*, 2005) proposent une relation dose-réponse à partir d'une autre approche. La relation a été estimée en utilisant un modèle Bêta-Poisson. Ce modèle a été construit à partir des données mensuelles sur le nombre de *V. vulnificus* dans les huîtres du Golfe du Mexique, de la consommation estimée d'huîtres crues et des cas de septicémies associés à *V. vulnificus* signalés par mois. La relation dose-réponse (Figure 3) a donc été réalisée pour la population sensible seulement, et modélise le risque de septicémie. L'équation de la courbe est donnée en Annexe 8.

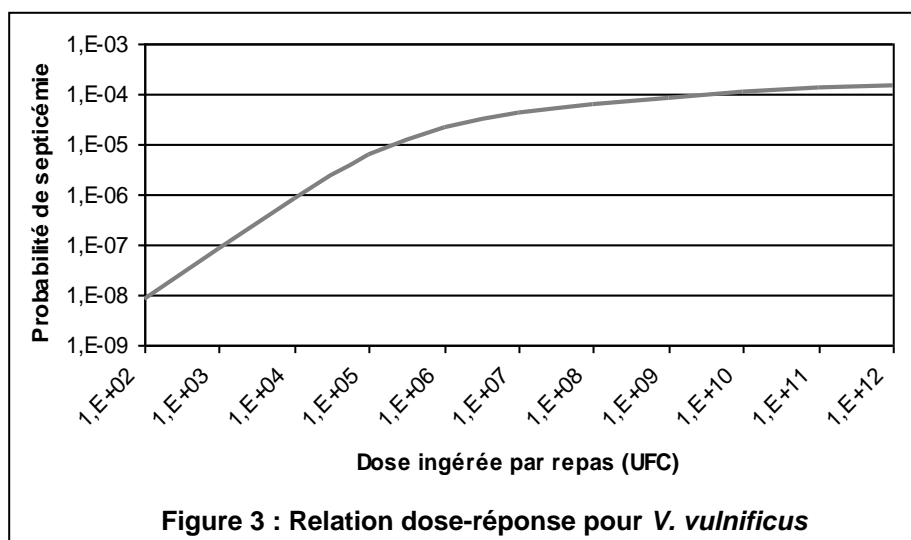


Figure 3 : Relation dose-réponse pour *V. vulnificus*

Cette courbe présente le risque lié à la consommation d'huîtres crues. En effet, celles-ci sont à l'origine de la plupart des cas de septicémies liées à *V. vulnificus*. En l'absence de données complémentaires, on considèrera cependant que la même courbe est valable pour l'ingestion d'autres produits de la mer.

➤ Exposition par contact

Comme pour *V. cholerae*, on dispose d'une étude permettant d'estimer la dose létale 50 (DL_{50}), à partir d'injections sous-cutanées. Poole et Oliver (1978) ont effectué des tests sur des souris. Une injection sous-cutanée de $2 \cdot 10^8$ cellules d'une souche de *V. vulnificus* chez 34 souris a entraîné des tuméfactions locales puis la mort des 34 souris. La DL_{50} a été estimée pour 3 souches. Les injections n'ont été faites que sur 4 souris. Pour 2 des 3 souches, la DL_{50} est de $2 \cdot 10^5$ et $9 \cdot 10^5$. Pour la troisième souche, les doses testées ont atteint 10^8 cellules, mais n'ont pas permis de déterminer la DL_{50} .

D) Conditions de croissance

V. vulnificus a été isolé dans des eaux dont la température était comprise entre 9 et 43 °C. Toutefois, on le retrouve à des concentrations relativement faibles aux températures extrêmes. Sa multiplication est favorisée quand la température de l'eau

atteint 20 à 30 °C. En dessous de 10 °C, l'isolement est difficile puisque la plupart des bactéries sont sous forme viable non cultivable.

Une salinité modérée (entre 15 et 25 g/l) lui est favorable, mais on peut le retrouver sur une gamme de salinité variant de 1 à 35 g/l (Strom *et al.*, 2000). Au cours de la campagne de mesures sur le site du Blayais, il a été retrouvé pour des salinités variant de 1 à 27 g/L, avec une abondance plus élevée entre 2 et 8 g/L. Il semble qu'au-delà de 30 g/L, la quantité de vibrions diminue fortement, indépendamment de la température (FAO *et al.*, 2005).

Le pH doit être compris entre 5 et 10 (Price *et al.*, 2003).

2.4 Exposition

Le but de cette étape est d'estimer les concentrations et les doses d'exposition aux agents pathogènes.

2.4.1 Voies d'exposition et population exposée

A) Approche globale

a) *Voies d'exposition retenues*

Compte tenu des modes de contamination cités précédemment, **deux voies d'exposition sont retenues : l'ingestion et le contact cutané.** Pour *V. parahaemolyticus*, la voie d'exposition la plus souvent en cause est l'ingestion. Toutefois, les septicémies seraient essentiellement dues à une exposition par contact. Elles sont certes moins fréquentes, mais beaucoup plus graves. Les deux voies doivent donc être retenues.

b) *Vecteurs d'exposition*

Pour l'exposition par contact, l'eau et les produits de la mer sont susceptibles de provoquer une infection. En revanche, le choix des produits pouvant être à l'origine d'une infection par ingestion demande plus de réflexion.

Les produits de la mer les plus souvent concernés sont les mollusques bivalves filtreurs, et plus particulièrement les huîtres. En effet, leur mode d'alimentation repose sur la filtration d'eau, qui leur permet de retenir les particules alimentaires, mais aussi les bactéries. Il y a donc un effet de concentration des bactéries. Comme les coquillages sont consommés entièrement, le risque de contamination est élevé.

Les crustacés et les poissons sont aussi à l'origine d'infections. Ils sont contaminés par les vibrions de par la filtration d'eau et leur nutrition (les vibrions sont présents sur le plancton et sur les animaux marins).

Le cas des poissons est particulier et l'on peut s'interroger sur la pertinence de prendre en compte cette source d'exposition. En effet, les vibrions sont retrouvés majoritairement dans le mucus et dans l'intestin (Hoi *et al.*, 1998; Thampuran *et al.*, 1998). Comme les poissons sont uniquement consommés après éviscération, on pourrait penser que ce procédé élimine tout risque lors de la consommation. Toutefois, selon Davies *et al.* (2001), les vibrions peuvent aussi être retrouvés dans la chair. On peut aussi penser qu'une contamination de la chair lors de l'éviscération est possible. Les nombreux cas d'infections observés au Japon suite à la consommation de poisson cru semblent appuyer ces faits. L'augmentation actuelle de la consommation de poissons crus sous forme de sushi et sashimi n'autorise donc pas à écarter cet aliment comme cause possible de contamination. En revanche, selon les cas, cette exposition pourra parfois être considérée comme négligeable, car il faut rappeler que les concentrations dans les poissons seront plus faibles que dans les bivalves filtreurs.

On peut d'autre part se demander si les aliments cuits sont véritablement une source de contamination, puisque la plupart des bactéries ne résistent pas à la cuisson. Il semble toutefois que la cuisson des aliments ne soit pas un élément suffisant pour éviter

tout risque d'infection. Par exemple, des cas d'infections dues à l'ingestion d'écrevisses cuites ont eu lieu aux Etats-Unis (Bean *et al.*, 1998). De même, une étude a été menée par Lowry *et al.* en 1989 sur des produits de la mer crus et cuits dans des restaurants de La Nouvelle-Orléans. *V. parahaemolyticus* a été retrouvé dans 50 % des échantillons d'huîtres cuites, 67 % des échantillons de crevettes bouillies et 33 % des échantillons de salades de crabe (USFDA, 2005). Il faut noter cependant que de nombreux cas peuvent être dus à une recontamination du produit après sa cuisson.

Dans son avis du 2 décembre 1999, l'AFSSA rappelle cependant que la cuisson des produits de la mer n'est pas toujours suffisante pour inactiver les *Vibrio*, et que les hémolysines de *V. parahaemolyticus* sont thermostables. **Le caractère cru ou cuit du produit n'est donc pas une donnée pertinente pour évaluer le risque de denrées contaminées par *Vibrio*.**

L'ingestion d'eau durant la baignade ou la pratique de sports nautiques est une voie d'exposition possible, puisque les vibrions peuvent vivre libres dans l'eau ou fixés au phytoplancton ou sur les sédiments. Toutefois, cette voie n'a pas été retenue, car elle ne semble pas constituer une voie d'exposition significative : les quantités d'eau ingérées sont très faibles, et les concentrations en vibrions seront beaucoup plus faibles que celles retrouvées dans les coquillages qui concentrent les bactéries. Il en est de même pour l'ingestion de sable par les enfants lors des jeux sur la plage.

c) Population exposée

Pour l'exposition par ingestion, toute personne consommant des produits de la mer (coquillages, crustacés, poissons), est exposée. Il peut s'agir de produits achetés à un professionnel ou récoltés / pêchés par le consommateur lui-même.

Pour l'exposition par contact, la population exposée regroupe les personnes au contact de la mer ou de ses produits, qui ont une plaie préexistante ou qui se blessent lors des activités citées ci-après. On peut citer par exemple les baigneurs, les personnes pratiquant des sports nautiques, les pêcheurs (pêche professionnelle ou récréative), les écaillers, les consommateurs de produits de la mer qui se blessent lors de leur préparation...

Enfin, pour les deux voies considérées, il faut rappeler que les personnes les plus susceptibles de développer une infection sont les personnes immunodéprimées.

d) Schéma d'exposition

Compte tenu des informations données dans les paragraphes précédents et du type de sites étudiés, le schéma global d'exposition peut alors être le suivant.

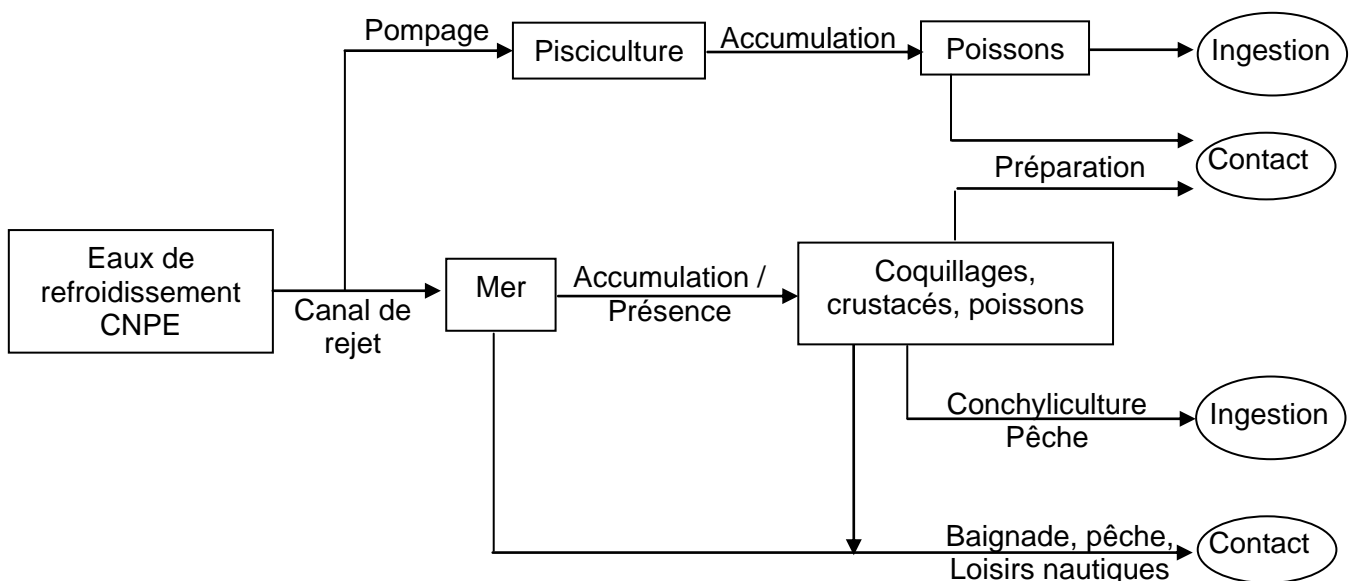


Figure 4 : Schéma d'exposition

Plusieurs scénarios d'exposition devront ainsi être envisagés. De plus, il sera utile de réaliser un scénario pour les adultes et un scénario pour les enfants, puisque les données relatives à la consommation et à la baignade ne seront pas les mêmes pour ces deux catégories. De même, pour la voie d'exposition par ingestion, il semble pertinent de proposer un scénario particulier pour les forts consommateurs de poissons.

B) Site de Gravelines

D'après les activités répertoriées au § 2.1.2, les expositions pouvant être considérées sont les suivantes :

- l'ingestion de moules pêchées le long du canal de rejet dans le cadre d'une activité de pêche à pied
- l'ingestion de bar commercialisé par la société Aquanord ou pêché dans le canal de rejet
- le contact cutané d'une blessure avec l'eau de mer durant la baignade
- le contact cutané d'une blessure avec des coquillages lors du ramassage ou avec des poissons (dans le cadre de la pêche récréative, ou dans le cadre professionnel lors de la manipulation des poissons chez Aquanord).

Les poissons provenant de la ferme aquacole sont majoritairement distribués à des grossistes. Une partie est consommée localement dans les restaurants. Toutefois, ces deux circuits de commercialisation sont très complexes, et il est difficile et long d'obtenir des données les caractérisant, notamment sur le temps de stockage des aliments, le temps de transport, de cuisson... De nombreuses incertitudes encadrent aussi l'exposition des pêcheurs, du fait notamment des comportements propres à chaque consommateur. Toutefois, les étapes menant jusqu'à la consommation des aliments seront moins nombreuses. A titre d'exemple, on ne considèrera donc que l'exposition des pêcheurs de moules.

Les expositions par contact apparaissent importantes, mais aucune donnée suffisante ne permet de réaliser une évaluation quantitative des risques. Ces expositions existent mais ne pourront donc pas être considérées.

Ainsi, dans le cadre de cette étude, à titre d'exemple, seul un scénario sera retenu. On considère un pêcheur qui récolte des moules à la sortie du canal de rejet pour sa consommation personnelle. Les moules restent à température ambiante (30 °C) durant 2 heures pendant la récolte. Elles sont ensuite disposées durant 1 heure à température ambiante au domicile du consommateur (25 °C), avant d'être préparées. Elles ne sont à aucun moment réfrigérées. Elles sont consommées après une cuisson de quelques minutes.

2.4.2 Approche globale de l'estimation de l'exposition par ingestion

Pour connaître la dose ingérée par l'individu, deux facteurs essentiels doivent être renseignés, à savoir la **concentration en vibrions dans l'aliment considéré, et le schéma de consommation** de l'aliment en question.

Les vibrions étant des organismes vivants, leur concentration dans l'aliment évolue tout au long du « parcours » suivi par celui-ci. Ainsi, la dose qui sera effectivement ingérée par le consommateur dépend de toutes les étapes précédant la consommation, à savoir le stockage, la réfrigération, la cuisson... Ceci nécessite donc dans un premier temps de connaître la concentration en vibrions dans l'aliment lors de la récolte/pêche.

Le schéma global suivant récapitule les différentes étapes à considérer pour estimer la dose ingérée. Il présente également le type de données à rechercher pour y parvenir. Ce schéma s'inspire du modèle proposé par l'USFDA (2005), mais a été généralisé et modifié pour répondre au cas étudié (moins spécifique que celui de l'USFDA).

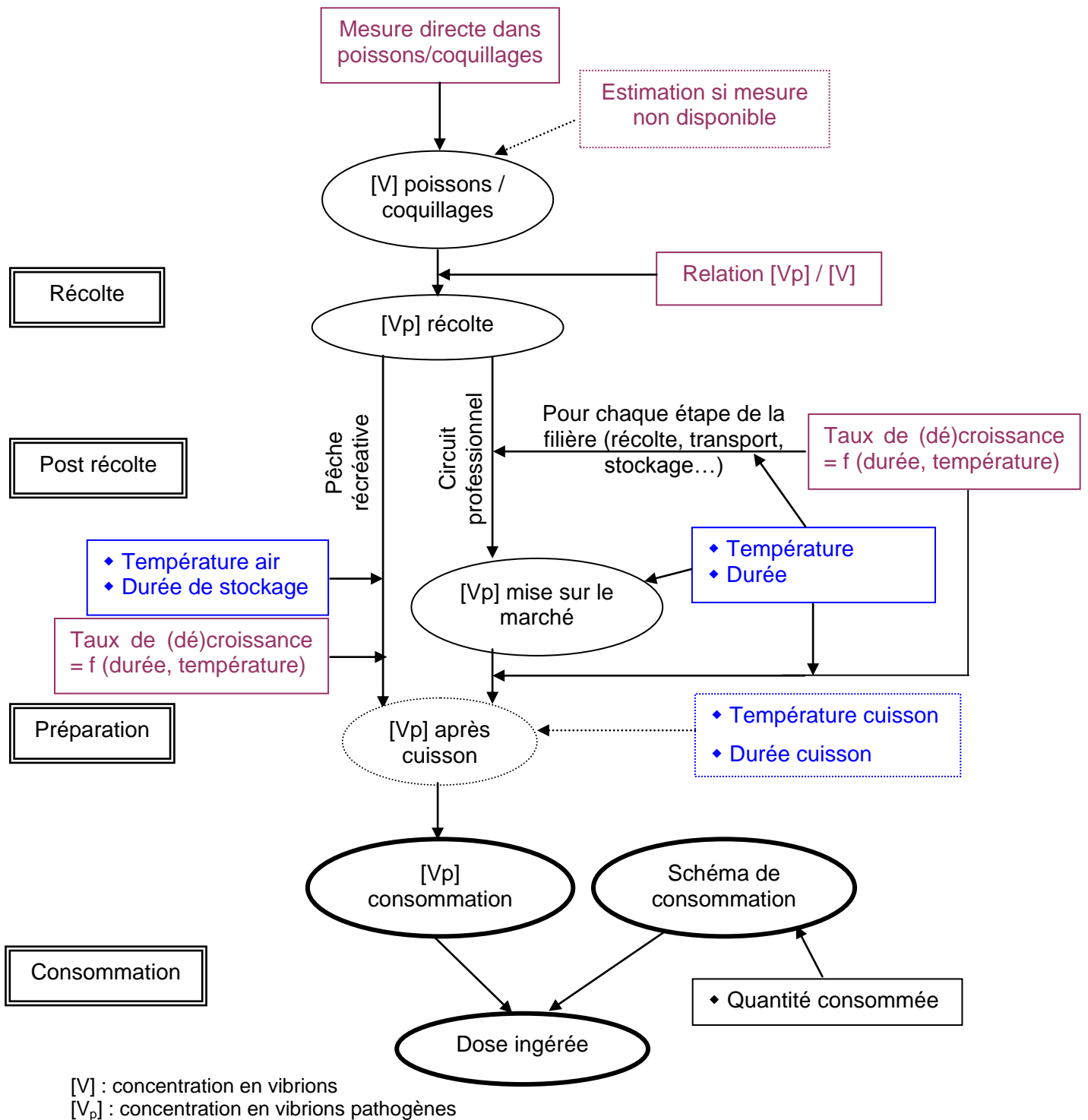


Figure 5 : Etapes de l'évaluation de l'exposition par ingestion

Les paragraphes suivants proposent des méthodes permettant d'estimer la quantité de vibrions à chacune des étapes, compte tenu des données actuellement disponibles.

2.4.3 Concentration initiale en vibrions dans l'aliment

De nombreux facteurs ont une influence sur la quantité de bactéries présentes dans les organismes, même si le rôle de beaucoup d'entre eux reste encore mal connu. On retrouve ainsi des facteurs physiques (température, salinité, disponibilité en nutriments, pH, taux d'oxygène, ensoleillement, remise en suspension des sédiments...), des facteurs biologiques propres aux organismes (espèce considérée, taux de filtration de l'eau, état physiologique, capacité de phagocytose...), et des facteurs liés à l'écologie du milieu (blooms planctoniques, prédation, compétition avec d'autres bactéries...). La méthode la

plus fiable pour connaître la concentration initiale en vibrions (lors de la récolte ou de la pêche des produits) est donc la mesure directe. Toutefois, aucun suivi n'est actuellement réalisé. Compte tenu des mesures effectuées lors des campagnes de surveillance et des études existantes, deux autres méthodes semblent envisageables :

- les campagnes actuelles permettent de connaître la concentration en vibrions dans l'eau. Si l'on dispose d'un « facteur de concentration », on peut alors estimer le nombre de vibrions accumulés par l'organisme animal (méthode 1) ;
- la quantité de vibrions est estimée à partir de paramètres physiques de l'eau (méthode 2).

Méthode 1 : Plusieurs publications rapportent des facteurs de concentration dans les bivalves filtreurs. Desenclos (1996) cite un gradient de concentration pour les micro-organismes et substances toxiques pouvant dépasser 50 pour un. Selon Morris (2003) et Pruzzo *et al.* (2005), la concentration en vibrions serait 100 fois plus élevée dans les mollusques filtreurs que dans l'eau.

Une étude réalisée en 1989 par IPL pour l'Ifremer³ avait permis d'établir une relation entre la concentration en vibrions dans les coquillages (moules et coques) et dans l'eau, à partir de 60 mesures (Annexe 9). Pour de faibles concentrations en vibrions dans l'eau (environ 100 vibrions/l), le coefficient de concentration est de l'ordre de 50. Ce coefficient diminue fortement lorsque la concentration dans l'eau augmente. Par exemple, pour une concentration de 10⁶ vibrions/l d'eau, le coefficient vaut seulement 2,5.

Cette relation permet d'avoir une estimation de la concentration totale en vibrions dans les moules et les coques. On supposera alors que la répartition des différentes espèces de vibrions dans l'eau et dans les coquillages est la même, même si l'étude a montré que des variations peuvent être observées (il semblerait que *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* s'accumulent plus). Cette méthode ne tient donc pas compte des spécificités des espèces.

Méthode 2 : Parmi tous les facteurs cités précédemment intervenant sur la concentration en vibrions dans les coquillages, la température et la salinité de l'eau ont été particulièrement étudiées. Ainsi, les études de Cook *et al.* (2002a) et de De Paola *et al.* (1990) portant sur *V. parahaemolyticus*, et l'étude de Motes *et al.* (1998) portant sur *V. vulnificus* ont montré que **la température est le facteur qui a le plus d'influence sur les variations de concentration en vibrions dans les huîtres**. A l'inverse, la salinité semble avoir une influence limitée. Ainsi, la température explique 60 et 43 % des variations de concentration en *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* respectivement, et la salinité, 13 et 3 %. L'USFDA puis l'OMS et la FAO ont ainsi proposé des modèles uniquement basés sur la température (FAO *et al.*, 2005; USFDA, 2005).

Pour *V. parahaemolyticus*, l'USFDA a établi des modèles, à partir de trois sources de données différentes, rapportant notamment la concentration en *V. parahaemolyticus* dans les huîtres et la température de l'eau dans plusieurs états et sur plusieurs mois. Les méthodes de mesure utilisées étant différentes, les données n'ont pas été regroupées, et trois modèles ont été retenus.

³ Source : document interne EDF

Tableau 9 : Etudes reliant la température de l'eau et la quantité de vibrions dans les coquillages

	Source de données	Echantillons		Seuil de détection
		Nombre	Origine	
Modèle 1	De Paola et al., 1990	61	Nord Atlantique Médio Atlantique Golfe du Mexique Pacifique nord-ouest	10 UFC/g
Modèle 2	WSDH, 2000-2001	262	Pacifique nord-ouest	0,3 UFC/g
Modèle 3	Cook et al., 2002	624	Nord Atlantique Médio Atlantique Golfe du Mexique	10 UFC/g

La comparaison des estimations des 3 modèles à différentes températures montre que deux d'entre eux (modèles 1 et 3) sont très proches. J'ai donc choisi de ne conserver que le 3^{ème}, les échantillons testés étant beaucoup plus nombreux. Le second a également été conservé car la limite de détection de la méthode utilisée est plus faible. Les modèles retenus sont présentés en Annexe 11. Pour une même température, les concentrations sont globalement plus faibles avec le modèle 2 qu'avec le modèle 3.

Pour *V. vulnificus*, l'OMS et la FAO proposent un modèle quadratique à partir des données de Motes *et al.*, valable pour des températures comprises entre 10 et 32 °C, et pour une salinité inférieure à 30 ‰ (Annexe 11).

Pour une salinité supérieure à 30 ‰, *V. vulnificus* n'est que très rarement détecté, et à des concentrations faibles (cf. § 2.3.3D). Un modèle quantitatif est donc difficile à établir. Ces valeurs de salinité ne sont de toute façon pas rencontrées sur les sites.

Pour *V. cholerae*, une seule publication (del Refugio Castaneda Chavez *et al.*, 2005) où les données sur la température et la présence de vibrions sont associées a été trouvée. Toutefois, pour les vibrions, il ne s'agit **pas de données quantitatives**, mais de pourcentages d'isolation, ce qui ne permet pas d'établir la relation voulue.

Compte tenu des données utilisées, cette deuxième méthode est valable pour les huîtres. On peut alors se demander si l'utilisation des modèles est possible pour d'autres bivalves. La comparaison des taux de filtration de l'eau de différents mollusques peut donner une indication quant à la concentration des bactéries. L'Annexe 10 présente les taux de filtration moyens pour différents bivalves filtreurs, en fonction de la température. Les modèles semblent extrapolables aux moules, puisque des taux de filtration du même ordre de grandeur sont observés. Les autres mollusques ayant des taux de filtration plus faibles, l'utilisation des modèles entraînera a priori une surestimation des concentrations en vibrions. Toutefois, les coques et les palourdes par exemple ont un tube digestif plus long, ce qui augmente donc le temps de rétention des bactéries dans l'organisme (DRASS Pays de la Loire, 2006). On considérera donc que les modèles sont utilisables pour ces coquillages.

Pour les crustacés et les poissons, aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature. Dans une première approche d'évaluation des risques, l'utilisation du même facteur de concentration que pour les coquillages (méthode 1) permet d'obtenir une première estimation. Toutefois, des données complémentaires seraient nécessaires pour limiter les incertitudes.

Bilan sur les 2 méthodes proposées :

Comme évoqué précédemment, de nombreux facteurs sont négligés. Les deux méthodes ont cependant l'avantage de tenir compte des variations saisonnières, la première utilisant la concentration en vibrions dans l'eau (elle-même fonction des variations saisonnières), et la seconde utilisant directement la température. La première méthode présente l'avantage d'utiliser des données françaises, sur le site du CNPE de

Gravelines, alors que toutes les données utilisées dans la méthode 2 sont américaines. En revanche, la méthode 2 présente des équations spécifiques pour *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. Or, d'après les modèles proposés, il semblerait que pour une même température, *V. vulnificus* s'accumule plus fortement.

Ainsi, compte tenu des données disponibles, la méthode 2 semble la plus appropriée pour *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. En revanche, la méthode 1 sera utilisée pour *V. cholerae*.

Dans le cadre d'une évaluation ponctuelle, la mesure directe serait bien sûr la plus pertinente.

2.4.4 Concentration en vibrions pathogènes dans l'aliment lors de la récolte

L'étape précédente permet d'estimer la quantité de vibrions présents dans l'organisme animal. Toutefois, seules les souches pathogènes sont susceptibles de provoquer des infections, et il est donc plus pertinent de disposer des quantités de vibrions pathogènes uniquement.

Pour *V. parahaemolyticus*, les souches considérées comme pathogènes sont les souches produisant la TDH et la TRH. Toutefois, la seule relation dose-réponse disponible est établie uniquement pour les souches produisant la TDH (cf. § 2.3.2C), toxine dont le rôle est le mieux connu aujourd'hui. **On considérera ainsi que les souches pathogènes sont celles produisant la TDH.**

L'USFDA (2005) a listé les études américaines s'intéressant au pourcentage de vibrions pathogènes (produisant la TDH) présents dans les huîtres par rapport aux vibrions totaux. Les résultats sont présentés en Annexe 12. Ils varient d'une étude à l'autre, mais le pourcentage d'isolats pathogènes est globalement plus élevé dans le Pacifique. Pour ne pas minimiser le risque, on considérera que **3 % des vibrions sont pathogènes**. La recherche bibliographique a permis de trouver une référence supplémentaire française s'intéressant aux gènes *tdh* et *trh* (Robert-Pillot *et al.*, 2004). Toutefois, elle n'est pas intégrée dans le tableau car les résultats portent à la fois sur des échantillons d'eau et de produits de la mer sans distinction entre les deux. Cette étude est toutefois intéressante car sur 35 souches de *V. parahaemolyticus* issues d'huîtres et de coques récoltées en France, aucune ne contient le gène codant pour la TDH.

Pour *V. vulnificus*, les facteurs de virulence sont nombreux, et il semble que la plupart des souches soient pathogènes (cf. § 2.3.3B). Etant donné le manque actuel de connaissances scientifiques, on considérera que **toutes les souches sont pathogènes**, et que leur virulence est identique. Pour *V. cholerae*, il existe aussi de nombreux facteurs de virulence. De la même façon, on considérera donc que toutes les souches sont pathogènes.

2.4.5 Evolution de la concentration en vibrions pathogènes dans l'aliment jusqu'à sa consommation

La quantité de vibrions à la consommation est influencée par les **conditions de stockage des produits**. Ainsi, la température de l'air à la récolte, la durée entre la récolte et la réfrigération, la durée de réfrigération avant consommation, la cuisson éventuelle sont autant de facteurs à prendre en compte pour estimer la concentration en vibrions. Les principaux sont étudiés ci-dessous.

A) Effet du stockage à l'air ambiant

Que l'on soit dans le cas de la pêche récréative ou de la pêche professionnelle, les produits restent toujours stockés à l'air libre pendant une certaine durée avant leur réfrigération. **La croissance des vibrions continue** donc pendant cette période. Il peut

s'agir du stockage suivant immédiatement la récolte ou la pêche, ou du stockage suivant l'achat du produit. Cette durée de stockage peut être très variable. Le comportement du consommateur est difficile à évaluer, mais il aura un rôle important sur le développement des vibrions. Par exemple, il apparaît que pour les produits frais vendus en rayon réfrigéré, 74 % des consommateurs déclarent laisser leurs achats à température ambiante de 15 à 45 minutes et plus (Volatier, 2000).

Gooch *et al.* (2002) ont montré qu'après un stockage à 26 °C pendant 10 h, la concentration en *V. parahaemolyticus* dans les huîtres est multipliée par 50. Après 24 h, elle est multipliée par 790. Twedt (1989) rapporte une augmentation de *V. parahaemolyticus* de 10^2 à 10^8 UFC/g de crevettes après 24 h de stockage à 25 °C, et de 5.10^3 à 5.10^8 UFC/g d'huîtres après 7 jours de stockage à 12 °C. *V. parahaemolyticus* a une croissance très rapide, puisque des temps de génération de 12 à 18 minutes ont été rapportés dans les produits de la mer (European Commission, 2001). Cook *et al.* (1994) ont aussi mis en évidence que le stockage d'huîtres à température ambiante (18 °C) pendant 30 h entraîne une augmentation de la quantité de *V. vulnificus* de 0,75 \log_{10} . Un stockage d'huîtres à une température moyenne de 28 °C pendant 7,5 h entraîne une augmentation des vibrions de l'ordre de 1,3 \log_{10} (FAO *et al.*, 2005).

Des modèles de croissance fonction du taux initial en vibrions, de la température de l'air et du temps de stockage permettent de connaître la nouvelle concentration en vibrions. Les modèles utilisés par l'USFDA, la FAO et l'OMS sont de la forme suivante :

$$\log_{10} N(t) = \min \left[\log_{10} N_0 + \mu_m t, A \right]$$

Avec : N(t) : concentration en vibrions au temps t (UFC/g)

N_0 : concentration initiale en vibrions (UFC/g)

μ_m : taux de croissance maximal (\log_{10} UFC/g/h)

t : temps de stockage (h)

A : concentration maximale en vibrions (UFC/g)

La concentration maximale en vibrions est fixée à 10^6 UFC/g. En effet, diverses études ont montré que cette valeur n'est jamais dépassée, quel que soit le moment de la mesure (au moment de la récolte ou plus tard). On suppose dans ces modèles que l'air et le produit de la pêche sont rapidement en équilibre et donc que la température du produit est assimilable à celle de l'air. Il reste donc à déterminer le taux de croissance maximal.

Pour *V. parahaemolyticus*, les études réalisées directement sur des produits de la mer ne permettent pas d'établir une relation. L'USFDA s'est donc basée sur une autre étude utilisant un modèle (Miles *et al.*, 1997) : les mesures sont réalisées sur un bouillon et non sur les huîtres directement. Miles propose une équation permettant d'obtenir le taux de croissance maximal à partir de la température et de l'activité de l'eau. Cette dernière est fixée à la valeur permettant une croissance optimale des vibrions. Les estimations obtenues sur les bouillons sont alors comparées aux données de l'étude de Gooch *et al.*, pour déterminer le facteur correcteur à appliquer pour passer du bouillon à l'organisme animal. Les données chiffrées sont présentées en Annexe 13. L'étude source a été utilisée car le modèle de l'USFDA présente une différence non expliquée avec le modèle de Miles *et al.*

Pour *V. vulnificus*, les études de Cook *et al.* donnent les augmentations de concentration en vibrions pour des températures et temps de stockage différents. Cela permet donc de disposer directement d'un taux de croissance maximal. Les détails du calcul sont présentés en Annexe 13.

Pour *V. cholerae*, de telles études ne sont pas actuellement disponibles.

B) Effet de la réfrigération

La réfrigération doit être considérée en deux phases. La première est la phase de refroidissement de l'aliment, pendant laquelle on peut considérer que le taux de croissance des vibrions diminue jusqu'à devenir nul. La deuxième correspond à une décroissance des vibrions.

➤ Phase de refroidissement

Des données propres à chaque espèce ne sont pas disponibles. On fait donc l'hypothèse d'un même comportement des trois espèces concernées. L'USFDA a proposé le modèle suivant pour *V. parahaemolyticus*. En supposant que le taux de croissance diminue linéairement pendant la période de refroidissement, jusqu'à atteindre une croissance nulle, le taux de croissance global s'exprime de la façon suivante :

$$\mu_m \times \frac{H+1}{2}$$
, H correspondant à la durée de refroidissement, et μ_m étant le taux de croissance maximal calculé précédemment.

Si l'on considère qu'il faut en moyenne 5,5 heures pour que l'aliment entier refroidisse jusqu'à sa température de stockage (USFDA, 2005), le taux de croissance durant cette période est donc estimé à 3,25 μ_m .

➤ Phase de décroissance

Gooch *et al.* rapportent une décroissance du taux de *V. parahaemolyticus* de 0,8 log₁₀ UFC/g dans des huîtres stockées pendant 14 à 17 jours à 3 °C, soit un taux de décroissance compris entre 0,05 et 0,06 log₁₀ UFC/g/j. Le taux de décroissance de *V. vulnificus* est sensiblement le même, puisqu'il a été estimé par Cook *et al.* (2002b) à 0,041 log₁₀ UFC/g/jour.

Aucune donnée relative à *V. cholerae* n'a été répertoriée. On supposera que le taux de décroissance est de l'ordre de celui observé pour les deux autres espèces étudiées.

Le devenir de l'aliment après réfrigération a un rôle important. En effet, il a été montré que la conservation à 5 °C pendant 48 heures de surimi et de hachis de poisson cuit permet une réduction importante de *V. parahaemolyticus* ; par contre, une nouvelle multiplication bactérienne est observée lorsque les produits sont placés à 25 °C.

C) Effet de la congélation

La congélation permet de réduire la contamination en vibrions, mais leur persistance pendant la conservation à -20 °C dépend du conditionnement et de la nature du produit congelé (Malle, 2003). Johnston *et al.* (2002) ont montré que les vibrions ne sont pas inactivés à -20°C. Par contre, la congélation d'huîtres durant 30 jours à -30 °C et -15 °C permet une diminution de la quantité de *V. parahaemolyticus* de 1,6 et 1,2 log₁₀ respectivement (USFDA, 2005).

D) Effet de la cuisson

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de la chaleur sur les vibrions. Les résultats ne sont toutefois pas toujours convergents. Vanderzant *et al.* (1972) ont montré que de faibles quantités (5.10²/ml) de *V. parahaemolyticus* inoculées dans des broyats de crevettes sont détruites lorsque les broyats sont chauffés à 60, 80 ou 100°C pendant une minute. Avec des quantités plus importantes (2.10⁵/ml), il reste des vibrions après un chauffage à 60 et 80 °C pendant 15 minutes. **Après une minute à 100 °C, aucun ne survit.** Le chauffage de 52 souches de *V. vulnificus* à 47 °C pendant 78 secondes permet de réduire leur concentration d'une unité logarithmique ; à 50 °C pendant 10 minutes, *V. vulnificus* n'est plus détectable (Andrews *et al.*, 2000; European Commission, 2001; Johnston *et al.*, 2002). Andrews *et al.* ajoutent qu'en moins de 10 minutes à 50 °C,

V. parahaemolyticus n'est lui aussi plus détectable. En revanche, Johnston *et al.* ont montré qu'à 55 °C, il faut 9 minutes pour réduire la quantité de *V. parahaemolyticus* de 5 log₁₀. La pasteurisation à basse température (50 °C), recommandée aux Etats-Unis pour les huîtres pourrait donc être insuffisante. Une élimination totale des vibrions est obtenue après pasteurisation à 70 °C pendant 2 minutes.

Il apparaît donc qu'une **cuisson** effectuée par le consommateur dans des conditions normales **supprime une quantité importante de vibrions, mais ne permet parfois pas de les éliminer en totalité**. Le risque devrait cependant être largement réduit. La pasteurisation à basse température semble en revanche moins efficace. *V. vulnificus* est globalement plus sensible à la chaleur que *V. parahaemolyticus*. Il ne faut pas oublier qu'après la cuisson, les vibrions restant peuvent se multiplier à nouveau s'ils ne sont pas conservés au frais (< 4 °C).

2.4.6 Schéma de consommation

Plusieurs sources permettent d'obtenir des informations quant aux quantités de poissons, coquillages et crustacés ingérées. Toutefois, la plupart d'entre elles fournissent une quantité moyenne consommée par jour et par personne. Ces données sont en général bien adaptées dans le cadre de l'évaluation des risques chimiques. Toutefois, dans le cadre des risques liés aux vibrions, il s'agit d'un **risque ponctuel lors de la prise d'un repas** (il n'y a pas de risque dû à l'accumulation du produit dans l'organisme). Il faut donc disposer **des portions consommées par repas** de poissons, crustacés et coquillages, et non d'une quantité moyenne consommée par jour par personne.

Dans la mesure du possible, l'utilisation de données locales est préférable, puisque l'on peut observer des différences importantes d'une région à une autre. Toutefois, en l'absence de données locales, des données nationales, voire étrangères, peuvent permettre d'avoir une estimation des portions consommées par repas.

Pour le site de Gravelines, la recherche bibliographique n'a pas permis de trouver de données locales. Les informations recueillies pourront donc servir pour la réalisation d'une évaluation des risques sur un autre site que celui de Gravelines.

Peu de sources d'informations ont été trouvées. Les données disponibles pour les poissons sont rassemblées dans le tableau suivant. Il s'agit de données moyennes pour les poissons en général, et non par espèce. On peut toutefois considérer que les quantités consommées sont globalement équivalentes d'une espèce à une autre.

Tableau 10 : Quantités de poissons consommées par repas

Source	Population étudiée	Type de poisson	Portion moyenne	Percentile 95
Ricoux <i>et al</i> (2005)	Pêcheur en eau douce adulte (> 18 ans) bassin Adour Garonne	Poisson d'eau douce	121 g	217 g
		Poisson d'eau de mer	126 g	-
Volatier ⁽¹⁾ (Volatier, 2000)	Adulte (> 15 ans), population française	Tout poisson	152 g	-
NCEA ⁽²⁾ (1997)	Enfant (< 15 ans), population américaine	Tout poisson	68 g	185 g
	Adulte (> 15 ans), population américaine	Tout poisson	125 g	290 g

⁽¹⁾ données non publiées, tirées de Ricoux *et al.*

⁽²⁾ National Center for Environmental Assessment

Les données concernant les percentiles 95 sont intéressantes puisqu'elles permettent d'estimer les quantités consommées par un fort consommateur de poisson. Les sites concernés étant situés en bord de mer, les consommations des produits considérés seront globalement plus importantes que les consommations moyennes de la population française.

Pour les coquillages tels que moules, coques, palourdes et pour les crustacés, les données sont peu nombreuses. Une recherche sur Internet a permis d'estimer les portions consommées. Les hypothèses prises sont présentées dans le Tableau 11.

Pour les huîtres, il est plus facile d'estimer les portions en combinant le nombre d'huîtres consommées et le poids de chair par huître. Selon une enquête réalisée en Floride, les portions d'huîtres les plus courantes sont 6, 12 ou 24 huîtres par repas, ce qui semble a priori se rapprocher des portions françaises (Degner *et al.*, 1994). On considérera qu'un adulte moyen consomme 12 huîtres par repas, un adulte fort consommateur, 24 huîtres et un enfant, 6 huîtres. Des données sur le poids moyen des huîtres selon leur origine ont été obtenues auprès de l'Ifremer (Fleury *et al.*, 2005). Les portions consommées sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 11 : Quantités de coquillages et crustacés consommées par repas

	Poids moyen	Portion moyenne enfant	Portion moyenne adulte	Portion adulte fort consommateur
Moules, coques, palourdes ⁽¹⁾	-	70 g	130 g	260 g
Crevettes	-	50 g	100 g	200 g
Huîtres (Aquitaine)	6,9 g/huître	40 g	85 g	170 g
Huîtres (Normandie)	5,7 g/huître	35 g	70 g	140 g

⁽¹⁾ consommées en plat principal

2.5 Application à Gravelines

L'application de cette méthode au cas de Gravelines a été réalisée selon les hypothèses du scénario d'exposition retenu au § 2.4.1B). On rappelle que l'on considère un individu exposé aux vibrions suite à l'ingestion de moules, récoltées au niveau du canal de rejet. Ces moules sont laissées à l'air ambiant (28 °C) pendant 2 heures, le temps de la récolte, puis pendant une heure au domicile du pêcheur (25 °C) avant leur préparation. Une cuisson de quelques minutes est effectuée avant consommation.

2.5.1 Calcul de la dose d'exposition

Les données de base sont la concentration en vibrions dans l'eau et la température. Compte tenu des données disponibles, et dans le cadre d'une première approche, nous avons choisi de retenir pour chaque espèce la concentration maximale en vibrions dans l'eau ayant été rencontrée au rejet sur plusieurs années. On note également la valeur de température associée à chaque concentration. Les hypothèses prises pour appliquer les différents modèles et les calculs sont présentés en Annexe 14. Les données initiales et les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau suivant.

Tableau 12 : Quantités moyennes estimées de vibrions (UFC)

	T	Concentration maximale /l d'eau	Quantité vibrions /g chair de moule			
			V _{total} à la récolte	V _{pathogènes} à la récolte	après 2 h à 30 °C	après 1 h à 25 °C
<i>V. cholerae</i>	28,8 °C	10 ⁶	6,98.10 ³	6,98.10 ³	?	?
<i>V. parahaemolyticus</i>	28,8 °C	6.10 ⁵	3,89.10 ² ⁽¹⁾	11,7	2,95.10 ²	2,51.10 ³
			1,78.10 ² ⁽²⁾	5,3	1,35.10 ²	1,00.10 ³
<i>V. vulnificus</i>	27,2 °C	3.10 ⁴	1,62.10 ³	1,62.10 ³	5,25.10 ³	1,20.10 ⁴

⁽¹⁾ modèle 1 ⁽²⁾ modèle 2

Comme l'effet de la cuisson est mal connu, on réalise le calcul de la dose d'exposition à partir des quantités de vibrions présentes juste avant la cuisson. La quantité de vibrions ingérée sera donc largement surestimée. Le tableau suivant présente les doses d'exposition moyennes par classe de consommateur.

Tableau 13 : Doses d'exposition aux vibrions par repas (UFC)

	Enfant	Adulte	Adulte fort consommateur
<i>V. parahaemolyticus</i> ⁽¹⁾	1,8.10 ⁵	3,3.10 ⁵	6,5.10 ⁶
<i>V. parahaemolyticus</i> ⁽²⁾	7,0.10 ⁴	1,3.10 ⁵	2,6.10 ⁵
<i>V. vulnificus</i>	8,4.10 ⁵	1,6.10 ⁶	3,1.10 ⁶

⁽¹⁾ Modèle 1 ⁽²⁾ Modèle 2

2.5.2 Caractérisation du risque

Les courbes dose-réponse présentées au § 2.3 permettent d'estimer le risque lié à la consommation d'un repas de coquillages. Pour *V. parahaemolyticus*, il s'agit du risque de contracter une gastro-entérite, quel que soit le type de population. D'après la dose ingérée calculée ci-dessus, on constate que la probabilité d'infection est estimée à $9,6.10^{-2}$ pour un fort consommateur. Le risque commence pour des quantités de vibrions de l'ordre de 10⁶ UFC, mais avec une probabilité faible. Pour *V. vulnificus*, la courbe dose-réponse présente le risque pour les personnes immunodéprimées de développer une septicémie. Pour une dose de 3,1.10⁶ UFC, le risque est estimé à $3,1.10^{-5}$. On rappelle toutefois que la cuisson n'a pas été prise en compte. Pour *V. parahaemolyticus*, son effet reste incertain. En revanche, pour *V. vulnificus*, le risque d'infection devrait être beaucoup plus faible.

3 Discussion

3.1 Limites et incertitudes

L'évaluation quantitative du risque lié à une contamination biologique reste souvent incertaine compte tenu du manque de connaissances scientifiques, et donc des hypothèses qui doivent être prises. Dans le cas présent, les hypothèses et incertitudes ont été évoquées tout au long du mémoire. Les principales incertitudes sont toutefois rappelées ci-après. Elles permettent en effet de mettre en évidence certaines **lacunes scientifiques** et d'**identifier les besoins** pour mener une future évaluation quantitative des risques moins incertaine.

De façon générale, les données concernant **l'exposition par contact** sont très limitées, et ne permettent pas de mener à bien une évaluation des risques. Les seuils d'infection chez l'homme ne sont pas connus. Quelques études ont été réalisées sur les animaux pour *V. cholerae* et *V. vulnificus*, mais aucune courbe dose-réponse n'est aujourd'hui disponible. Cette voie d'exposition est d'autre part difficile à appréhender car il ne s'agit pas d'une simple exposition par contact cutané : le développement d'une infection requiert la présence d'une plaie. Une évaluation du risque nécessiterait donc de connaître notamment la surface de la plaie, donnée qui n'est actuellement pas recueillie dans les questionnaires de surveillance remplis lors d'un cas d'infection de plaie. La méconnaissance de cette voie d'exposition explique certainement le **peu de données disponibles sur *V. alginolyticus***. En effet, cette espèce conduit à des infections uniquement suite à une exposition par contact. Elle n'a pas été retenue dans l'étude du fait du manque certain de données bibliographiques. Toutefois, il est important de rappeler qu'il s'agit de l'espèce la plus fréquemment isolée lors des campagnes de surveillance, et à des quantités élevées. Des études complémentaires pourraient donc être très utiles. Dans le cadre de ces expositions par contact, on peut notamment penser à mettre en place une étude environnementale. Par exemple, dans le cas où le lien est établi entre l'infection à *V. alginolyticus* et la baignade en mer, une mesure des quantités de vibrions dans l'eau de mer pourrait permettre d'appréhender la dose d'infection. On peut toutefois s'interroger sur la pertinence de telles études. En effet, compte tenu du délai entre la mesure et le moment de la baignade, les quantités de vibrions peuvent varier fortement, du fait notamment des conditions météorologiques. En France, lors d'un cas clinique, aucune étude environnementale n'est menée.

L'étude a aussi fait ressortir le manque de connaissances scientifiques sur les **facteurs de virulence** des espèces étudiées. Pour *V. parahaemolyticus*, deux facteurs principaux sont aujourd'hui connus (TDH et TRH), mais d'autres peuvent exister. La méthode proposée ne prend en compte que la toxine TDH, ce qui sous-estime certainement le taux de vibrions pathogènes. Des études complémentaires sur les quantités de *V. parahaemolyticus* totaux et pathogènes (donc comportant les gènes *tdh* et *trh*) dans divers produits de la pêche permettraient d'obtenir une plus grande précision. Il faut toutefois rappeler que la relation dose-réponse actuellement disponible ne tient compte que de la toxine TDH. Pour *V. vulnificus* et *V. cholerae*, plusieurs facteurs de virulence ont été décrits, mais le taux de vibrions pathogènes par rapport aux vibrions totaux n'est pas connu. Ainsi, toutes les cellules ont été considérées comme pathogènes, ce qui maximise le risque.

De plus, les **relations dose-réponse** proposées pour *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* comportent de nombreuses incertitudes du fait du manque de données sur l'homme. L'absence d'une telle courbe pour *V. cholerae* non-O1/non-O139 ne permet pas de statuer sur le niveau de risque. Pour *V. vulnificus*, la courbe a été établie seulement pour les personnes présentant des facteurs de risque, puisqu'elles sont les principales concernées par les septicémies. En revanche, pour *V. parahaemolyticus*, la courbe modélise le risque de gastro-entérite pour la population générale. On peut donc se

demander si des doses plus faibles ne seraient pas suffisantes pour entraîner un risque chez les personnes atteintes d'une maladie du foie.

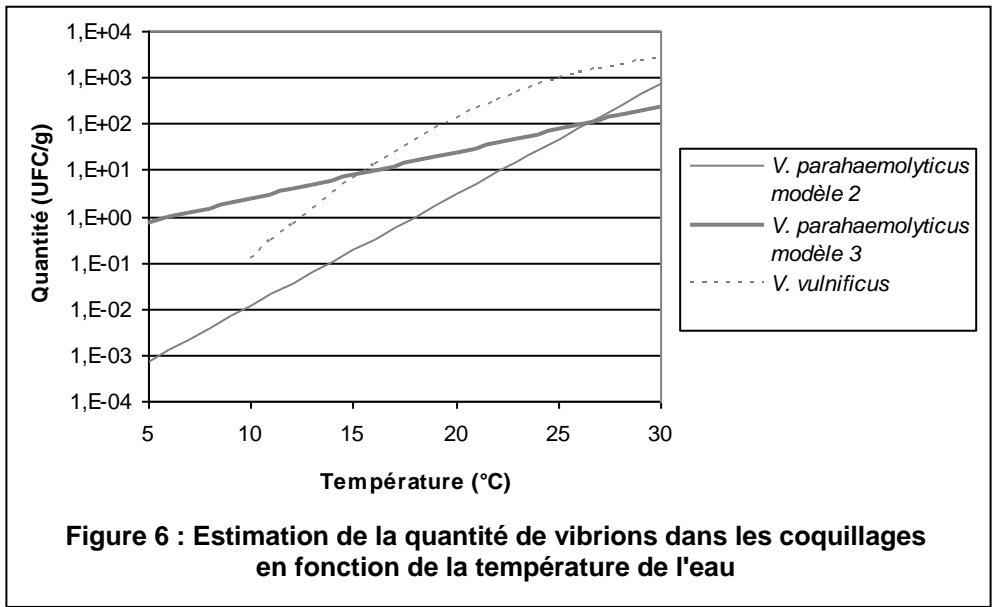
Le calcul de la dose d'exposition fait appel à des modèles. Ceux-ci sont construits à partir de données expérimentales, permettant de mieux appréhender les quantités de vibrions dans les coquillages ainsi que leur taux de croissance et décroissance en fonction de divers facteurs. Toutefois, pour *V. vulnificus* notamment, la plupart des études portent sur les huîtres (principal vecteur de contamination). Or, on peut penser que dans des matrices alimentaires différentes, le comportement des vibrions n'est pas le même. Dans cette étude, on a considéré que les résultats obtenus sur des huîtres sont extrapolables aux autres produits de la mer. Il serait toutefois pertinent de mettre en place des **études sur les poissons et crustacés**, car l'accumulation et la persistance des vibrions dans ces aliments est mal connue. **L'effet de la cuisson** reste aussi incertain. Des études complémentaires pourraient permettre de mieux prévenir les risques, même s'il semble que de nombreux cas soient dus à une recontamination de l'aliment après cuisson. Des mesures le plus près possible du consommateur diminueraient largement les incertitudes.

Enfin, il existe trop **peu de données sur *V. cholerae* non-O1/non-O139** pour mener une évaluation quantitative du risque. En effet, les sérotypes O1 et O139 à l'origine du choléra ont été très étudiés du fait de leur importance du point de vue sanitaire, mais les autres sérotypes restent assez mal connus. Des études propres aux souches non cholériques sur les conditions de croissance et de survie dans les aliments seraient donc nécessaires.

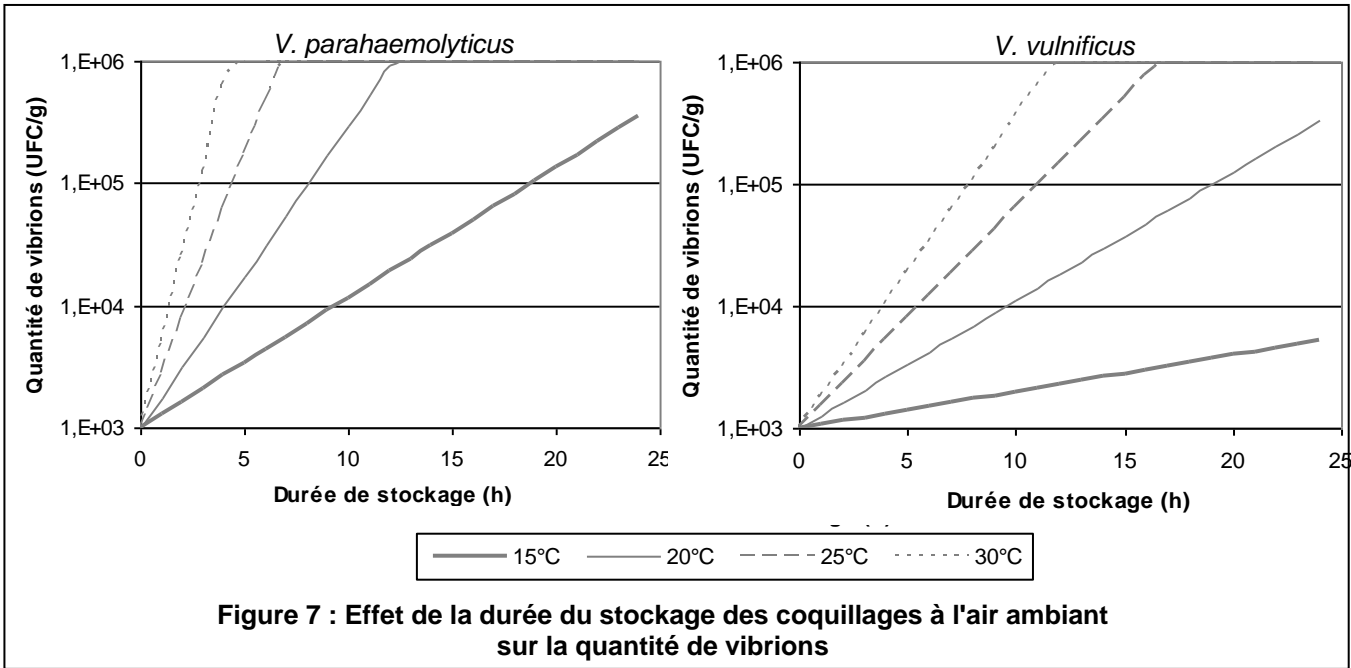
Au-delà des incertitudes liées au manque de connaissances scientifiques, la méthode proposée comporte d'autres limites. En effet, pour faire face à l'absence de mesures directes des taux de vibrions dans les produits de la mer, des hypothèses parfois discutables doivent être prises. Par exemple, la méthode proposée par l'USFDA puis par l'OMS et la FAO pour estimer la quantité de vibrions dans les coquillages est basée sur la température de l'eau uniquement. Or, les données des suivis environnementaux réalisés sur le site de Gravelines montrent que les quantités maximales de vibrions mesurées dans l'eau ne sont pas toujours retrouvées aux plus fortes températures. On peut donc penser qu'il en est de même pour les quantités retrouvées dans les coquillages. De plus, les modèles proposés ont été élaborés à partir d'études américaines, et il serait donc intéressant de valider ces modèles par des mesures dans les eaux et coquillages français. Ceci permettrait d'autre part de vérifier que les quantités de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* ne dépassent pas 10^4 UFC/g à la récolte (cf. § 3.2) et 10^6 UFC/g lors du stockage (cf. § 2.4.5A).

3.2 Importance des différents paramètres et gestion du risque

Parmi les différents paramètres étudiés, certains ont un rôle plus ou moins important dans la contamination des aliments. Une étude de sensibilité a été réalisée pour mieux appréhender le rôle des diverses étapes sur la quantité de vibrions présente dans les produits de la mer. Le graphique suivant (Figure 6) présente la variation de la quantité de vibrions dans les coquillages à la récolte en fonction de la température de l'eau.



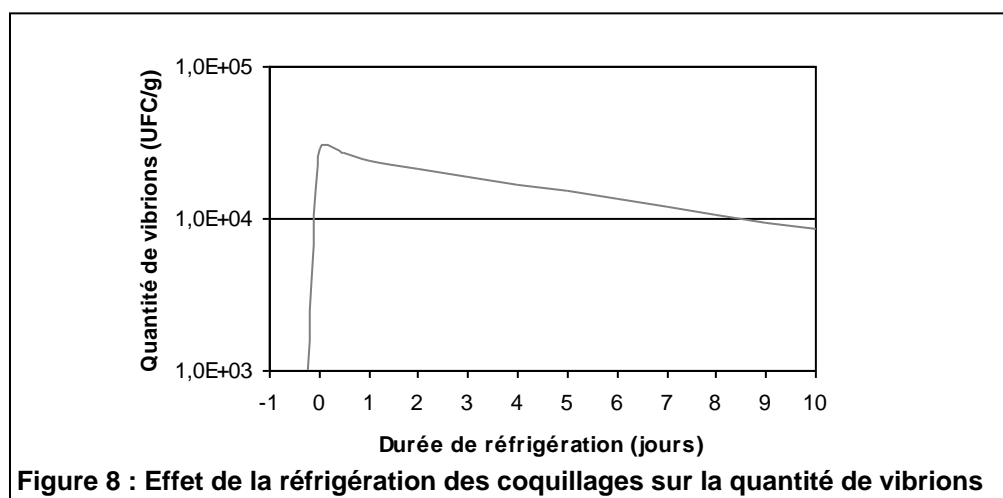
On constate que les quantités de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* ne sont jamais supérieures à 10^3 UFC et 5.10^3 UFC/g de chair de coquillage respectivement, même pour une température élevée de l'eau (30 °C). A de telles concentrations, les risques de contracter une infection sont minimes, voire inexistantes pour *V. parahaemolyticus*. Ceci montre que **les étapes de conservation de l'aliment vont jouer un rôle majeur**. Les graphiques suivants (Figure 7) présentent l'influence de la durée du stockage des coquillages à l'air ambiant, pour différentes températures. A titre d'exemple, la quantité initiale en vibrions est fixée à 10^3 UFC/g.



On observe que pour des durées de stockage allant de quelques heures jusqu'à une journée, la température joue un rôle très important. Par exemple, au bout de 5 heures à 15 °C, la quantité de vibrions augmente très peu ; en revanche, pour une même durée à 25 °C, on observe une augmentation de 2,5 log pour *V. parahaemolyticus*, et de presque 1 log₁₀ pour *V. vulnificus*. Globalement, on note aussi que la croissance de *V. parahaemolyticus* est plus rapide que celle de *V. vulnificus*, quelle que soit la température.

L'effet de la durée de réfrigération est représenté sur le graphique suivant. Il est modélisé pour une concentration initiale de 10^3 UFC/g. Le temps $t = 0$ correspond au

moment à partir duquel le produit atteint la température de réfrigération, c'est-à-dire environ 5 h 30 après sa mise au frais. Avant, les vibrions continuent de se multiplier car la température de l'aliment n'a pas suffisamment diminué.



On constate qu'après 10 jours de réfrigération, la baisse de la quantité de vibrions est de l'ordre de $0,5 \log_{10}$ seulement. La réfrigération permet donc de stopper la croissance des vibrions et d'amorcer une baisse de leur concentration, mais **en cas de fortes quantités de vibrions dans les aliments, cela ne permet pas de diminuer le risque de façon suffisante.**

Dans une approche de gestion du risque, ces éléments sont très importants. La quantité initiale de vibrions dans les aliments est bien sûr initialement liée à la quantité de vibrions dans l'eau et donc à la température de l'eau notamment. Toutefois, il s'agit d'un paramètre sur lequel il n'est pas possible d'agir. Pour les coquillages, on peut alors penser à agir directement sur l'aliment par le processus de purification. Toutefois, l'étude de Croci *et al.* (2002) a montré que ce processus est beaucoup moins efficace pour les vibrions que pour *E. coli* : après 44 h de purification, la quantité d'*E. coli* est divisée par 1 000, alors que celle de *V. parahaemolyticus* ne diminue que d'un facteur 10. Comme l'indicateur actuel est *E. coli*, les temps de purification sont limités, et ne suffiraient donc pas à réduire suffisamment la contamination en vibrions. De plus, les vibrions étant naturellement présents dans l'eau, il faudrait s'assurer que l'eau de dépuración ne contient pas de vibrions pour que le processus soit efficace.

En revanche, il est plus facile d'**agir sur les conditions de stockage à l'air ambiant**. D'une part, il est important de limiter la durée du stockage, particulièrement pour *V. parahaemolyticus*. D'autre part, il faut s'assurer que la température n'est pas trop élevée. Le comportement des exploitants et des consommateurs a donc un rôle prépondérant. Dans le cadre d'une commercialisation des produits de la mer, il sera donc très important de **connaître les pratiques (température et durée) de stockage, de manipulation voire de transformation des produits.**

3.3 Perspectives et recommandations pour EDF

Cette étude a montré qu'un réchauffement des eaux peut en effet augmenter le risque de contamination des produits alimentaires et qu'il existe donc bien un risque sanitaire. Il apparaît ainsi indispensable de **maintenir les campagnes de surveillance actuellement en place**, pour s'assurer que les concentrations en vibrions n'atteignent pas des valeurs trop élevées et pour surveiller les fréquences d'apparition des espèces les plus problématiques. Le suivi hebdomadaire conduit sur le site de Gravelines permet de répondre à cet objectif. En revanche, sur les autres sites, la fréquence des mesures étant beaucoup plus faible, il est difficile de tirer des conclusions quant à l'évolution des

vibrions. Il pourrait ainsi être pertinent d'**augmenter la fréquence des mesures**, particulièrement pendant l'été et le début de l'automne.

Malgré les nombreuses incertitudes, la méthode proposée permettra de fournir une estimation du risque. En vue d'une future évaluation du risque, on peut toutefois préconiser de réaliser des **mesures directes sur les produits de la mer**. Sur le site de Gravelines par exemple, des mesures de vibrions dans les coquillages trouvés le long du canal de rejet et sur les bars et dorades de la ferme aquacole seraient très utiles.

Ce rapport propose une première approche d'évaluation des risques. L'aspect « fréquence des infections » n'a toutefois pas été abordé par manque de temps, mais il serait intéressant de poursuivre l'étude dans cette voie-là. En effet, parmi les espèces étudiées, *V. vulnificus* n'est que rarement isolé par exemple. Il faudrait notamment coupler les données sur les fréquences d'isolement des vibrions et les fréquences de consommation de produits de la mer. En considérant d'autre part le nombre de personnes consommant ces produits, ceci permettrait d'aboutir à une estimation du nombre d'infections possibles. Pour *V. vulnificus*, il serait également intéressant de connaître le taux de personnes immunodéprimées, mais ces données n'ont pas été trouvées.

CONCLUSION

L'objectif de ce mémoire était d'apprécier la faisabilité d'une évaluation quantitative des risques sanitaires et de proposer une méthode d'évaluation applicable à l'ensemble des sites. Ce mémoire s'est ainsi attaché à recueillir les éléments nécessaires aux premières étapes de l'évaluation des risques, à savoir l'identification et la caractérisation des dangers, et l'estimation de l'exposition.

L'identification des dangers a permis de retenir trois espèces d'intérêt pour l'étude à partir de divers critères. L'étape de caractérisation des dangers a alors porté sur ces trois espèces. Deux voies d'exposition entrent en jeu dans les infections à vibrions : le contact cutané avec l'eau de mer ou les produits de la mer et l'ingestion de produits de la mer. Toutefois, seule l'exposition par ingestion a pu être étudiée, faute de données scientifiques suffisantes. Pour cette voie, une méthode permettant de suivre l'évolution de la concentration en vibrions dans les aliments depuis leur pêche jusqu'à leur consommation a été proposée.

L'étude a montré que l'évaluation quantitative du risque lié à l'ingestion de produits contaminés est réalisable, moyennant de nombreuses incertitudes, pour les espèces *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. Pour *V. cholerae* non-O1/non-O139, trop peu d'études sont disponibles à ce jour pour évaluer la dose ingérée, et la relation dose-réponse n'est pas connue. Selon les aliments considérés, les données sont plus ou moins abondantes.

En terme de gestion du risque, l'effort doit porter sur les conditions de stockage des aliments, et plus particulièrement sur la température. Comme il n'est pas possible de limiter les concentrations en vibrions dans l'eau, et donc dans les coquillages, il est en effet important de réduire au maximum les contaminations post-récolte. Pour l'entreprise EDF, il est essentiel de maintenir la surveillance actuellement en place, voire de la renforcer sur certains sites. Cette surveillance qualitative et quantitative des vibrions peut en effet constituer un bon indicateur quant à l'évolution de ces micro-organismes.

Par manque de temps, certains éléments n'ont pas été pris en compte, et il serait intéressant de poursuivre l'étude réalisée. Une voie d'étude pourrait notamment porter sur l'estimation de la fréquence des infections.

Au-delà du problème local lié au réchauffement de l'eau par les rejets des circuits de refroidissement des centrales nucléaires, la problématique des vibrions doit être replacée dans un contexte plus général. En effet, le réchauffement climatique laisse envisager une future augmentation des teneurs en vibrions. Les infections liées aux expositions par contact cutané particulièrement pourraient alors devenir plus fréquentes. Si les infections à vibrions ne représentent pas aujourd'hui un problème important de santé publique, on peut craindre que l'enjeu sanitaire devienne plus important dans les prochaines années.

Bibliographie

Directive 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE. *Journal officiel de l'Union européenne* L64, 37-51.

Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. *Journal officiel de l'Union européenne* L226, 83-127.

Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union européenne* L338, 1-26.

AFSSA (1999). Avis du 2 décembre 1999 relatif à la pathogénicité des vibrions. *Saisine 1999-SA-0013*.

AFSSA (2002). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques liés à la consommation de produits de la pêche importés, contaminés par certaines espèces de *Vibrio* (autres que *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*). *Saisine n° 2001-SA-0114*.

Anderson, A. M. L., Varkey, J. B., Petti, C. A., Liddle, R. A., Frothingham, R., and Woods, C. W. (2004). Non-O1 *Vibrio cholerae* septicemia: Case report, discussion of literature, and relevance to bioterrorism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49, 295-297.

Andrews, L. S., Park, D. L., and Chen, Y. P. (2000). Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters. *Food Addit Contam* 17, 787-791.

Bean, N. H., Maloney, E. K., Potter, M. E., Korazemo, P., Ray, B., Taylor, J. P., Seigler, S., and Snowden, J. (1998). Crayfish: a newly recognized vehicle for *Vibrio* infections. *Epidemiol Infect* 121, 269-273.

Bonnard, R. (2001). Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque. Ineris.

Bowdre, J. H., Poole, M. D., and Oliver, J. D. (1981). Edema and hemoconcentration in mice experimentally infected with *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 32, 1193-1199.

Canadian Food Inspection Agency (2005). Fish products standards and methods manual.

CDC (1998). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters - Pacific Northwest, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 47, 457-462.

CDC (1999a). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound - Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 48, 48-51.

CDC (1999b). *Vibrio* surveillance system, summary data, 1997-1998.

CDC (2000). Summary of infections reported to *Vibrio* surveillance system, 1999.

- CDC (2001). Summary of humans isolates reported to *Vibrio* surveillance system, 2000.
- CDC (2002). Summary of humans *Vibrio* isolates reported to CDC, 2001.
- CDC (2003). Summary of humans *Vibrio* isolates reported to CDC, 2002.
- CDC (2005a). Cholera and other *Vibrio* illness surveillance system, summary data, 2003.
- CDC (2005b). Summary of humans *Vibrio* isolates reported to CDC, 2004.
- CDC (2005c). *Vibrio* illnesses after hurricane Katrina - Multiple states, August - September 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 54, 928-931.
- Colodner, R., Chazan, B., Kopelowitz, J., Keness, Y., and Raz, R. (2002). Unusual portal of entry of *Vibrio vulnificus*: evidence of its prolonged survival on the skin. *Clin Infect Dis* 34, 714-715.
- Colwell, R. R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274, 2025-2031.
- Cook, D. W. (1994). Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in postharvest Gulf Coast shellstock oysters. *Appl Environ Microbiol* 60, 3483-3484.
- Cook, D. W., Bowers, J. C., and DePaola, A. (2002a). Density of total and pathogenic (tdh+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. *J Food Prot* 65, 1873-1880.
- Cook, D. W., O'Leary, P., Hunsucker, J. C., Sloan, E. M., Bowers, J. C., Blodgett, R. J., and DePaola, A. (2002b). *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. *J Food Prot* 65, 79-87.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., and Toti, L. (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* 92, 460-465.
- Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammond, R. M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N. H., Griffin, P. M., and Slutsker, L. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis* 181, 1661-1666.
- Davies, A. R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G. J. E., and Kirby, R. M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control* 12, 67-71.
- De Paola, A., Hopkins, L. H., Peeler, J. T., Wentz, B., and McPhearson, R. M. (1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol* 56, 2299-2302.
- Degner, R. L., and Petrone, C. (1994). Consumer and restaurant manager reaction to depurated oysters and clams. Florida Agricultural Market Research Center.
- del Refugio Castaneda Chavez, M., Sedas, V. P., Orrantia Borunda, E., and Reynoso, F. L. (2005). Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 50, 1641-1648.
- Delarras, C. (2003). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : réglementation, prélèvements, analyses. Tec&Doc, Paris.

Desenclos, J. C. (1996). Epidémiologie des risques toxiques et infectieux liés à la consommation de coquillages. *Rev Epidemiol Sante Publique* 44, 437-454.

DRASS Pays de la Loire (2006). Les coquillages. <http://pays-de-la-loire.sante.gouv.fr/> [Accessed 19 juillet 2006].

DRIRE Nord Pas-de-Calais (2005). L'industrie au regard de l'environnement - Eau.

Dumontet, S., Krovacek, K., Baloda, S. B., Grottoli, R., Pasquale, V., and Vanucci, S. (1996). Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio spp.* and planktonic copepods in the coastal marine environment in Southern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 19, 245-254.

EDF (1996). Eau et environnement : Guide pratique à l'usage des exploitants des centrales thermiques classiques et nucléaires.

EDF (2006). Infos nucléaires - Comment ça marche ? www.edf.com [Accessed 19 mai 2006].

European Commission (2001). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood).

Euzéby, J. P. (2005). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/garde.html> [Accessed 15 mai 2006].

FAO (2002). Rapport d'une consultation mixte FAO/OMS d'experts. Evaluation du risque pour *Campylobacter spp.* dans les poulets et pour *Vibrio spp.* dans les produits de la pêche, Bangkok.

FAO, and OMS (2001). Principes et directives régissant la conduite de l'évaluation des risques microbiologiques. In Codex alimentarius - Hygiène alimentaire - Textes de base - Deuxième édition.

FAO, and OMS (2005). Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters - Interpretative summary and technical report.

Fleury, P. G., Simonne, C., Claude, S., Palvadeau, H., Guilpain, P., d'Amico, F., Le Gall, P., Vercelli, C., and Pien, S. (2005). Réseau mollusques des rendements aquacoles (REMORA - huîtres creuses). Résultats des stations nationales, Année 2004. IFREMER.

Food Standards Australia New Zealand (2001). Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods.

Fournier, J. M., and Quilici, M. L. (2002). Infections à vibrions non cholériques. *EMC - Maladies Infectieuses* 8-026-F-15.

Geneste, C., Dab, W., Cabanes, P. A., Vaillant, V., and Quilici, M. L. (2000). Les vibrions non cholériques en France : cas identifiés en France de 1995 à 1998 par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 9, 38-40.

GIEC (2001). Changements climatiques 2001 : Rapport de synthèse. Résumé à l'intention des décideurs.

Gilbert, R., de Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C., Richards, J., Roberts, D., and Bolton, F. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Commun Dis Public Health* 3, 163-167.

- Gooch, J. A., DePaola, A., Bowers, J., and Marshall, D. L. (2002). Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *J Food Prot* 65, 970-974.
- Gulig, P. A., Bourdage, K. L., and Starks, A. M. (2005). Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol* 43 Spec No, 118-131.
- Hoi, L., Larsen, J. L., Dalsgaard, I., and Dalsgaard, A. (1998). Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl Environ Microbiol* 64, 7-13.
- Hong Kong Food and Environmental Hygiene Department (2001). Microbiological guidelines for ready-to-eat food.
- ICMSF (1986). Microorganisms in Foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto Press.
- International Society for Infectious Diseases (2006). Cholera, diarrhea & dysentery update. *Program for Monitoring Emerging Diseases* 30.
- InVS (2004). Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France.
- Jackson, J. K., Murphree, R. L., and Tamplin, M. L. (1997). Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish. *J Clin Microbiol* 35, 2098-2101.
- Johnston, M. D., and Brown, M. H. (2002). An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *J Appl Microbiol* 92, 1066-1077.
- Kaneko, T., and Colwell, R. R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J Bacteriol* 113, 24-32.
- Kaspar, C. W., and Tamplin, M. L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environ Microbiol* 59, 2425-2429.
- Lesne, J., and Fournier, J.-M. (2005). *Vibrio*. In Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments (M. Federighi, Ed.), pp. 189-217. Economica, Paris.
- Linkous, D. A., and Oliver, J. D. (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters* 174, 207-214.
- Lukinmaa, S., Mattila, K., Lehtinen, V., Hakkinen, M., Koskela, M., and Siitonen, A. (2006). Territorial waters of the Baltic Sea as a source of infections caused by *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139: report of 3 hospitalized cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54, 1-6.
- Malle, P. (2003). *Vibrio parahaemolyticus*. Fiches micro-organismes AFSSA.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.
- Miles, D. W., Ross, T., Olley, J., and McMeekin, T. A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 38, 133-142.

- Miossec, L. (2002). Les vibrions pathogènes pour l'homme : le risque associé au milieu marin en France, pp. 47. Ifremer.
- Morris, J. G., Jr. (2003). Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clin Infect Dis* 37, 272-280.
- Morris, J. G., Jr., Takeda, T., Tall, B. D., Losonsky, G. A., Bhattacharya, S. K., Forrest, B. D., Kay, B. A., and Nishibuchi, M. (1990). Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. *J Clin Invest* 85, 697-705.
- Motes, M. L., DePaola, A., Cook, D. W., Veazey, J. E., Hunsucker, J. C., Garthright, W. E., Blodgett, R. J., and Chirtel, S. J. (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* 64, 1459-1465.
- NCEA (1997). Exposure Factors Handbook. USEPA.
- Oliver, J. D. (2005). Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect* 133, 383-391.
- OMS (2004a). Changement climatique et santé humaine - Risques et mesures à prendre. Résumé.
- OMS (2004b). Directives pour la sécurité des eaux de baignade. Volume 1. Eaux côtières et eaux douces, Genève.
- Ou, T. Y., Liu, J. W., and Leu, H. S. (2003). Independent prognostic factors for fatality in patients with invasive *Vibrio cholerae* non-O1 infections. *J Microbiol Immunol Infect* 36, 117-122.
- Parola, P., and Raoult, D. (2004). Changements climatiques et maladies bactériennes. *Archives de pédiatrie* 11, 1018-1025.
- Poole, M. D., and Oliver, J. D. (1978). Experimental pathogenicity and mortality in ligated ileal loop studies of the newly reported halophilic lactose-positive *Vibrio spp.* *Infect Immun* 20, 126-129.
- Powell, J. L. (1999). *Vibrio* species. *Clin Lab Med* 19, 537-552.
- Price, R., and Tom, P. (2003). *Vibrio spp.* In Compendium of Fish and Fishery Product Processes, Hazards, and Controls. USFDA National Seafood HACCP Alliance.
- Pruzzo, C., Gallo, G., and Canesi, L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* 7, 761-772.
- Quilici, M. L., Guenole, A., and Fournier, J. M. (2003). Les infections à vibrions non cholériques en France : cas identifiés de 1999 à 2001 par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra. In Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000. InVS.
- Quilici, M. L., Guenole, A., Lemee, L., and Fournier, J. M. (2005a). Les infections à vibrions non cholériques en France : cas identifiés de 2001 à 2003 par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra. In Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000. InVS.
- Quilici, M. L., Robert-Pillot, A., Picart, J., and Fournier, J. M. (2005b). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerg Infect Dis* 11, 1148-1149.

Ricoux, C., and Gasztowtt, B. (2005). Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de forts consommateurs de produits de la pêche de rivière contaminés par des toxiques de l'environnement. Agence de l'eau Adour Garonne.

Robert-Pillot, A., Guenole, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.-M., and Quilici, M.-L. (2004). 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. *International Journal of Food Microbiology* 91, 319-325.

Rose, J. B., Huq, A., and Lipp, E. K. (2001). Health, climate and infectious disease : a global perspective. American Academy of Microbiology, Washington, D.C.

Simpson, L. M., Dry, M. A., and Oliver, J. D. (1987). Experimental *Vibrio cholerae* wound infections. *FEMS Microbiology Letters* 40, 89-93.

Société Française d'Énergie Nucléaire (2002). Introduction à l'énergie nucléaire. www.sfen.org [Accessed 19 mai 2006].

Strom, M. S., and Paranjpye, R. N. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection* 2, 177-188.

Thampuran, N., and Surendran, P. K. (1998). Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* in tropical fish and shellfish from Cochin (India). *Lett Appl Microbiol* 26, 110-112.

Theophilo, G. N., Rodrigues Ddos, P., Leal, N. C., and Hofer, E. (2006). Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48, 65-70.

Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Hoste, B., and Swings, J. (2005). Current trends in the vibrios taxonomy. *Vibrio 2005 Conference* (6-8 Novembre 2005), Ghent (Belgique).

USFDA (1992). The Bad Bug Book : Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. <http://www.cfsan.fda.gov/> [Accessed 15 mai 2006].

USFDA (2001). Fish and fisheries products hazards and control guidance.

USFDA (2005). Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters.

Vanderzant, C., and Nickelson, R. (1972). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Appl Microbiol* 23, 34-37.

Venkateswaran, K., Takai, T., Navarro, I. M., Nakano, H., Hashimoto, H., and Siebeling, R. J. (1989). Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella spp.* and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. *Appl Environ Microbiol* 55, 1591-1598.

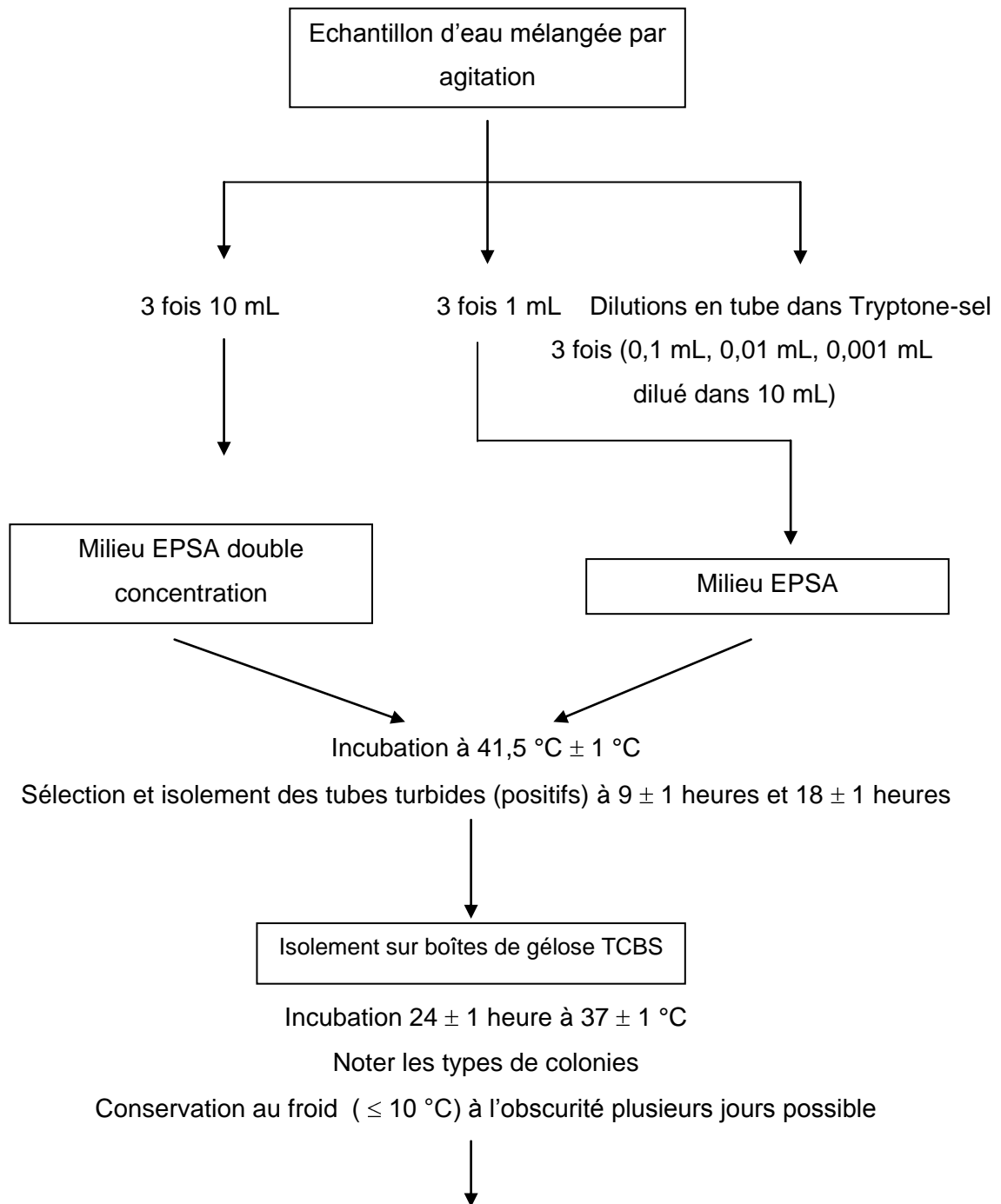
Volatier, J. L. (2000). Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires, pp. 158. AFSSA, Crédoc, Paris.

Liste des annexes

Annexe 1 : Méthodes de mesure et d'identification des vibrions	III
Annexe 2 : Réglementation concernant les vibrions dans les produits de la mer	VI
Annexe 3 : Symptômes associés aux infections à vibrions non cholériques.....	VII
Annexe 4 : Localisation du CNPE de Gravelines et de la zone d'étude	VIII
Annexe 5 : Entreprises rejetant en mer entre Calais et Dunkerque	IX
Annexe 6 : Impacts du rejet du CNPE à marée montante et descendante	X
Annexe 7 : Relation dose-réponse de <i>V. parahaemolyticus</i>	XII
Annexe 8 : Relation dose-réponse de <i>V. vulnificus</i>	XIII
Annexe 9 : Relation entre la concentration en vibrions dans l'eau et dans les coquillages (moules et coques)	XIV
Annexe 10 : Taux de filtration de l'eau des mollusques bivalves filtreurs.....	XV
Annexe 11 : Estimation de la concentration en vibrions dans les coquillages.....	XVI
Annexe 12 : Etudes caractérisant le pourcentage de <i>V. parahaemolyticus</i> pathogènes dans les coquillages	XVIII
Annexe 13 : Estimation de la croissance des vibrions à partir de la température de l'air	XIX
Annexe 14 : Estimation de la contamination des moules par les vibrions	XXI

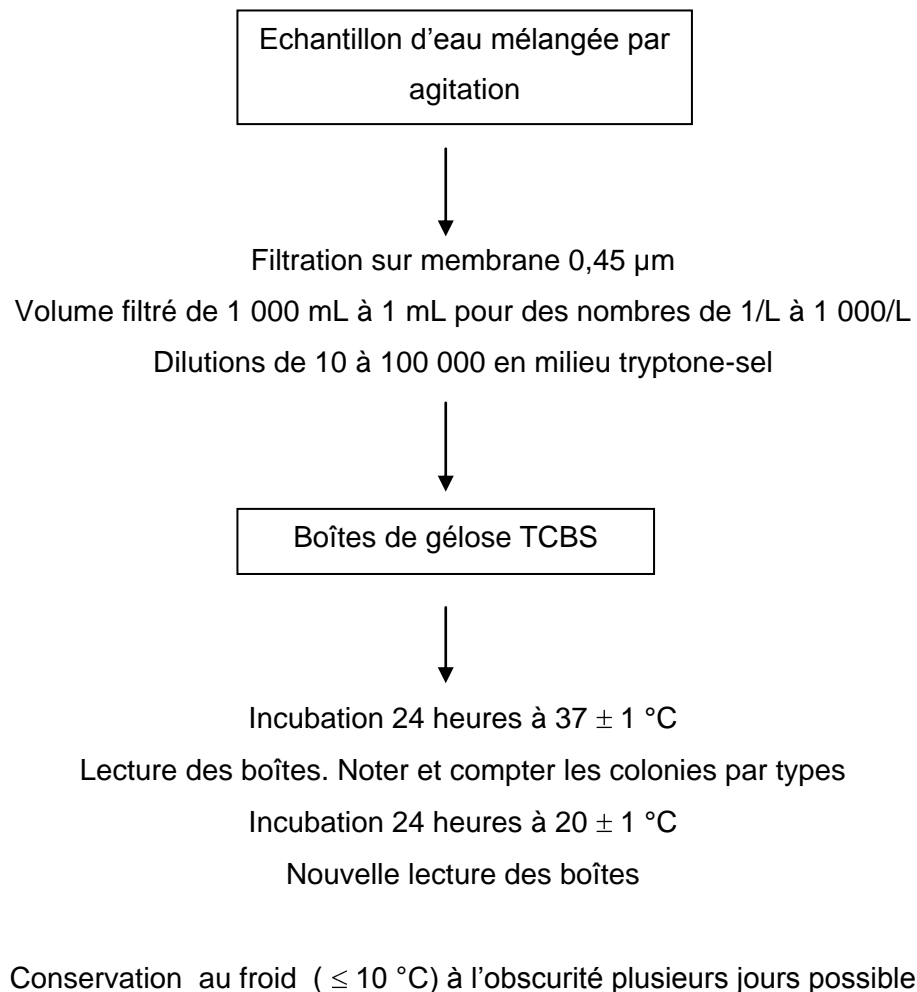
Annexe 1 : Méthodes de mesure et d'identification des vibrions

- Méthode classique par ensemencement en milieu liquide :



- Isolement sur gélose TCBS et incubation à 37 ± 1 °C pendant 24 heures.
Repiquage des colonies isolées sur un milieu solide en tube Marine Agar (milieu de Zobell) et incubation à 37 ± 1 °C pendant 24 heures.
Les tubes contenant la gélose nutritive salée ISO8914 (milieu Marine Agar) peuvent être conservés pendant 3 semaines au froid (≤ 10 °C) et à l'obscurité.

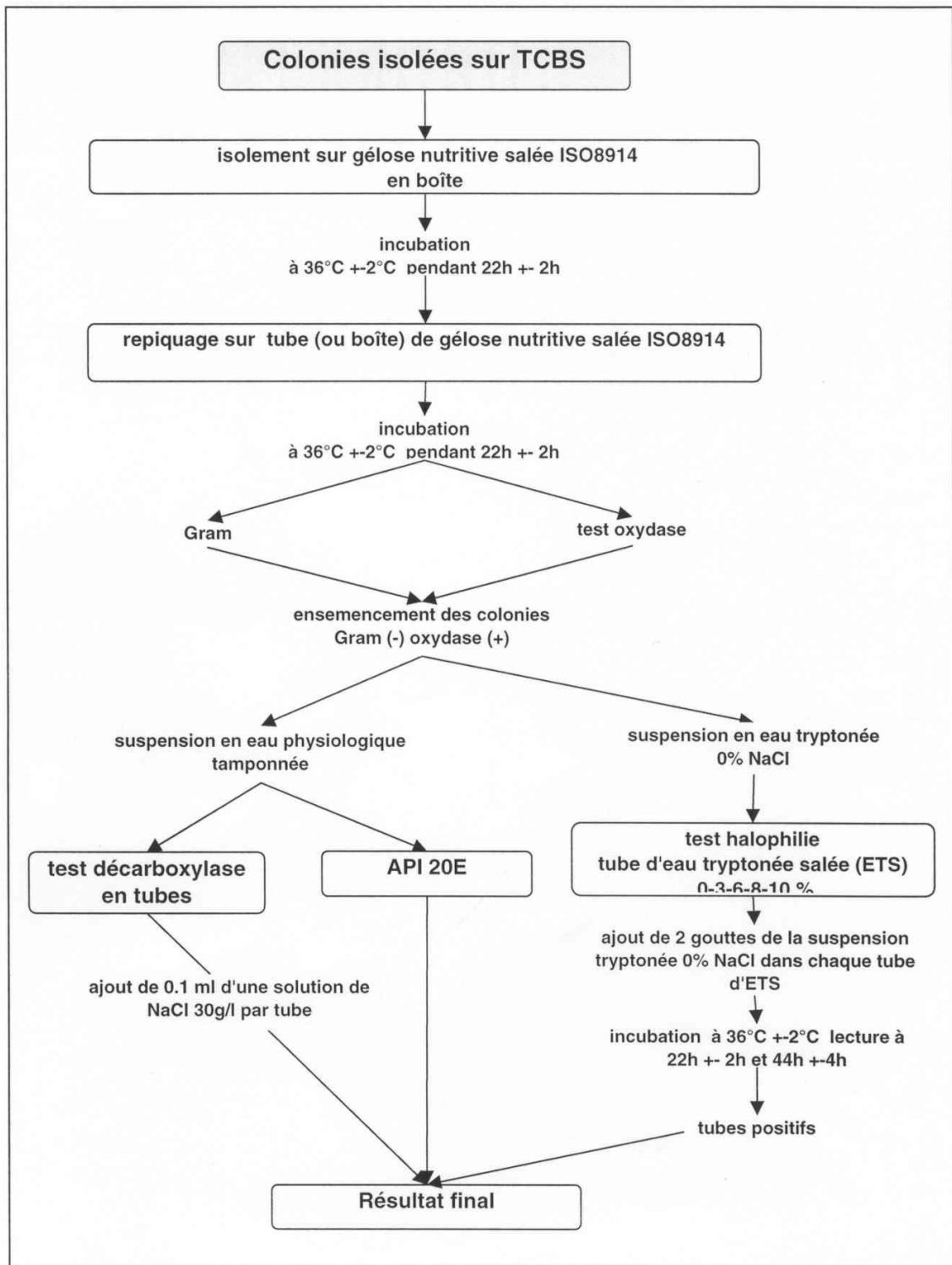
➤ Méthode EDF / IPL par filtration :



- Isolement sur gélose TCBS et incubation à 37 ± 1 °C pendant 24 heures.
- Repiquage des colonies isolées sur un milieu solide en tube Marine agar (milieu de Zobell) et incubation à 37 ± 1 °C pendant 24 heures.

Les tubes contenant la gélose nutritive salée ISO8914 (milieu Marine agar) peuvent être conservés pendant 3 semaines au froid (≤ 10 °C) et à l'obscurité.

➤ Méthode commune d'identification :



Annexe 2 : Réglementation concernant les vibrions dans les produits de la mer dans divers pays

- Hollande (European Commission, 2001)

Espèce	Seuil maximal de vibrions dans les homards, crabes, ou crevettes importés crus, cuits, frais ou surgelés (UFC/g)	
	A l'import	A la vente
<i>V. parahaemolyticus</i>	Non spécifié	100

- Royaume-Uni (Gilbert *et al.*, 2000)

Espèce	Qualité microbiologique (UFC/g)			
	Satisfaisant	Acceptable	Non satisfaisant	Inacceptable
<i>V. cholerae</i>	Non détecté dans 25 g de chair	-	-	Détecté dans 25 g de chair
<i>V. parahaemolyticus</i>	< 20	20 à 10 ²	10 ² à 10 ³	≥ 10 ³

- Chine : les recommandations sont basées sur celles établies par l'Agence de protection de la santé du Royaume Uni. Pour les vibrions, les critères sont les mêmes que ceux présentés ci-dessus (Hong Kong Food and Environmental Hygiene Department, 2001).

- Etats-Unis

En 2001, l'USEPA et l'USFDA recommandaient de ne pas consommer des produits de la pêche crus dans les cas suivants (USFDA, 2001) :

- présence de la souche toxigène O1 ou non-O1 de *V. cholerae*
- concentration en *V. parahaemolyticus* supérieure à 10⁴/g
- présence de *V. vulnificus*.

- Canada (Canadian Food Inspection Agency, 2005)

V. cholerae dans les produits cuits ou prêts à servir : absence dans les 5 échantillons de 25 g (ou dans le mélange de 125 g des cinq échantillons)

- Nouvelle-Zélande, pour *V. parahaemolyticus* (Food Standards Australia New Zealand, 2001)

Produit	Qualité microbiologique (UFC/g)			
	Satisfaisant	Acceptable	Non satisfaisant	Risque potentiel
Crustacés cuits		< 10*		
Aliments prêts à servir	< 3	3 à 10 ²	10 ² à 10 ⁴	> 10 ⁴

* sur 5 échantillons, avec au maximum 2 échantillons contaminés

**Annexe 3 : Symptômes associés aux infections à vibrions non cholériques
selon l'espèce et la fréquence d'apparition**

(USFDA, 1992; Linkous *et al.*, 1999; Powell, 1999; Strom *et al.*, 2000; European Commission, 2001; Miossec, 2002; Morris, 2003; Euzéby, 2005)

	Gastro-entérite	Septicémie primaire	Septicémie secondaire	Infection de plaie	Otite
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 ⁽¹⁾	+++	++	+	++	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++		+	++	+
<i>V. vulnificus</i>	?	+++	++	++	
<i>V. fluvialis</i>	+++				
<i>V. alginolyticus</i> ⁽²⁾	?		?	+++	++
<i>V. damsela</i>				+++	
<i>V. furnissii</i>	+++				
<i>V. hollisae</i>	+++	+			
<i>V. mimicus</i>	+++			+	+
<i>V. metschnikovii</i>	?	?			
<i>V. cincinnatiensis</i>		?			
<i>V. carchariae</i>				+++	

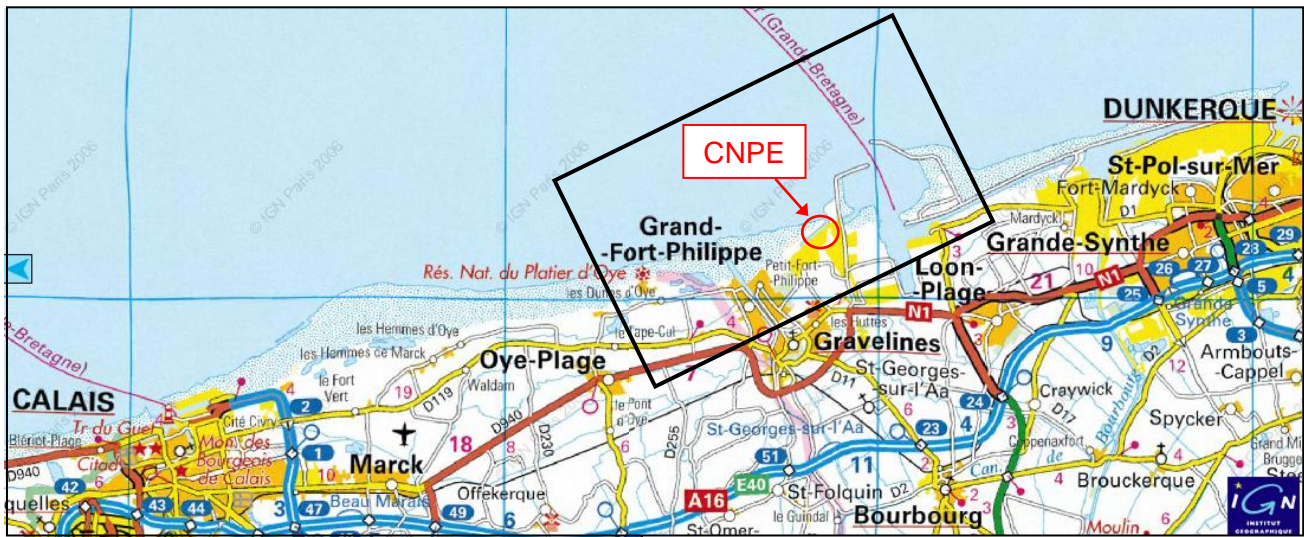
+++ : symptôme le plus fréquent ; ++ : symptôme occasionnel ; + : symptôme rare
? : association peu claire

⁽¹⁾ contrairement à la littérature internationale, il semble qu'en France, cette espèce soit à l'origine de tous ces symptômes sans que l'un d'entre eux soit vraiment dominant.

⁽²⁾ en France, la plus grande partie des cas sont des otites.

Annexe 4 : Localisation du CNPE de Gravelines et de la zone d'étude

vers Zuydcoote
→



□ Zone d'étude

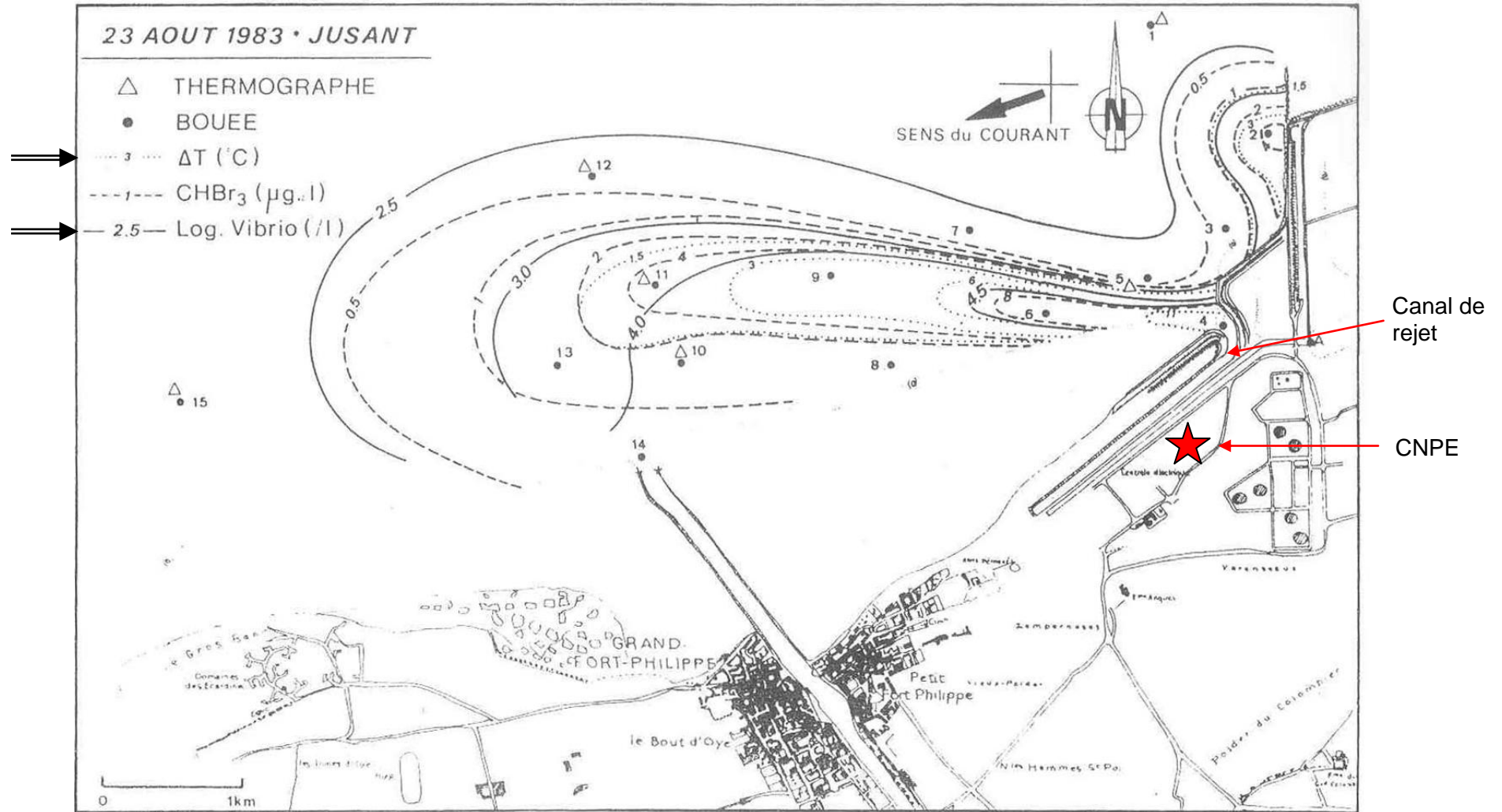
4 km

Annexe 5 : Entreprises rejetant en mer entre Calais et Dunkerque

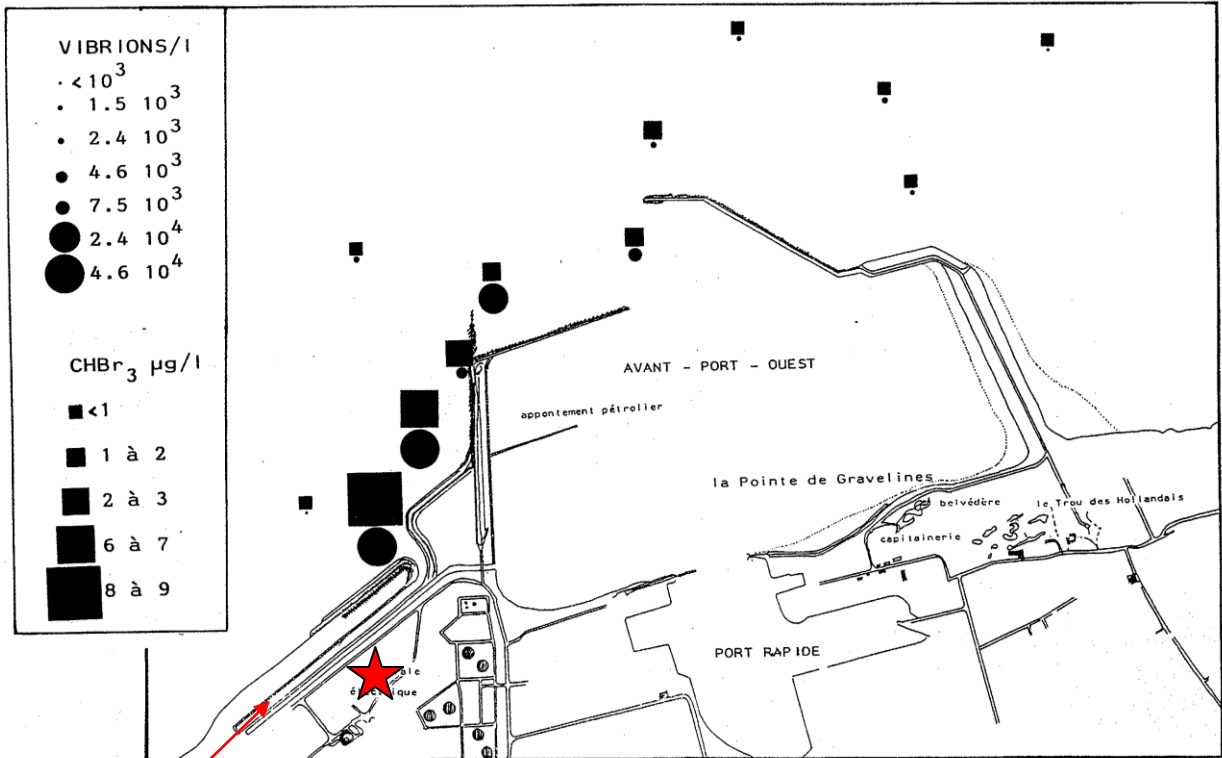
(DRIRE Nord Pas-de-Calais, 2005)

Etablissement	Commune	Activité
Aluminium Dunkerque SA	Loon-Plage	Production d'aluminium par électrolyse
Bus Valera SAS	Gravelines	Produits enrichis en chrome et nickel
Sollac Atlantique Dunkerque	Dunkerque	Sidérurgie
Umicore	Calais	Grillage de blendes et fabrication de H ₂ SO ₄
Ajinomoto Euroaspartame	Gravelines	Chimie fine
APF	Gravelines	Stockage d'hydrocarbures
Astra Zeneca Dunkerque Production	Dunkerque	Fabrication de médicaments et principes actifs pour industrie pharmaceutique
BASF Agri-production	Gravelines	Produits phyto-sanitaires
Calaire chimie SA	Calais	Fabrication de produits pour le marché pharmaceutique
Interor	Calais	Fabrication de produits intermédiaires pharmaceutiques
Polimeri Europa France SNC Dunes	Loon-Plage	Craquage d'hydrocarbures et fabrication de polyéthylène
Rubis Terminal Mole V	Dunkerque	Dépôt produits pétroliers et produits divers (engrais liquides, styrène...)
Rubis Terminal Uican	Dunkerque	Dépôt produits pétroliers
SRD Société de la raffinerie de Dunkerque	Dunkerque	Production de lubrifiants, paraffines et bitumes
Synthexim	Calais	Fabrication de produits intermédiaires pharmaceutiques
Tioxide Europe SAS	Calais	Fabrication de pigments d'oxyde de titane
Total France SA	Loon-Plage	Raffinage de pétrole
UCAR SNC	Calais	Fabrication d'électrodes en graphite
Charcuterie des Flandres	Dunkerque	Préparation de produits charcutiers
Daudruy Van Cauwenberghe et fils	Dunkerque	Huilerie
Fjord Seafood Appetit Marine	Dunkerque	Plats cuisinés aux produits de la mer
Jean Stalavan traiteur	Dunkerque	Plats cuisinés pasteurisés
Lafarge Aluminates	Loon-Plage	Cimenterie
Brampton Renold	Calais	Fabrication de chaînes de transmission et de tendeurs
Rexam beverage can SA	Gravelines	Boîtes métalliques pour boissons
Bellier et cie	Calais	Teinturerie
TCO	Calais	Teinturerie
STR Eurovia	Loon-Plage	Mise en décharge

Annexe 6 : Impacts du rejet du CNPE à marée montante et descendante



23 AOUT 1983 , FLOT



Annexe 7 : Relation dose-réponse de *V. parahaemolyticus*

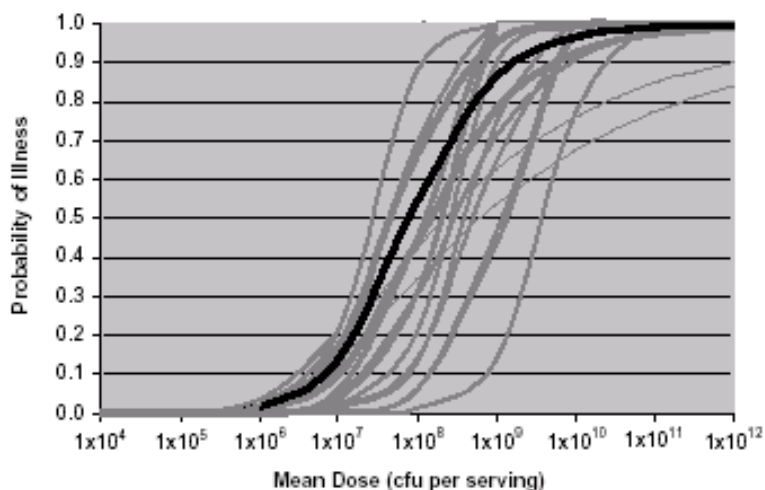
L'équation de la courbe dose-réponse pour *V. parahaemolyticus* est de la forme suivante :

$$p = 1 - \left(1 + \frac{d}{27\beta} \right)^{-\alpha}$$

avec : p : probabilité d'avoir une gastro-entérite
 d : dose d'exposition (quantité de vibrions ingérés) (UFC)
 α et β : constantes

Pour tenir compte des incertitudes, plusieurs courbes sont proposées, en fonction des valeurs de α et β. Ces valeurs sont données dans le tableau suivant, accompagnées de leur probabilité de rencontre. En gras figurent les valeurs les plus probables. L'ensemble des courbes correspondantes figure ci-après.

α	β	probabilité
1,47E+06	3,53E+14	0,00034
1,26E+07	7,20E+14	0,00412
636,53	1,65E+10	0,02058
35,81	5,42E+08	0,05487
20,84	1,99E+08	0,0823
14,87	8,78E+07	0,06584
10,58	2,99E+07	0,02195
3,89	2,28E+08	0,00069
1,31	2,93E+07	0,00823
0,52	3,61E+06	0,04115
0,47	1,50E+06	0,10974
0,6	1,31E+06	0,16461
1	1,80E+06	0,13169
8,59	1,30E+07	0,0439
0,15	2,33E+05	0,00034
0,19	2,29E+05	0,00412
0,25	2,36E+05	0,02058
0,32	2,57E+05	0,05487
0,43	3,04E+05	0,0823
0,69	4,34E+05	0,06584
6,92	4,49E+06	0,02195



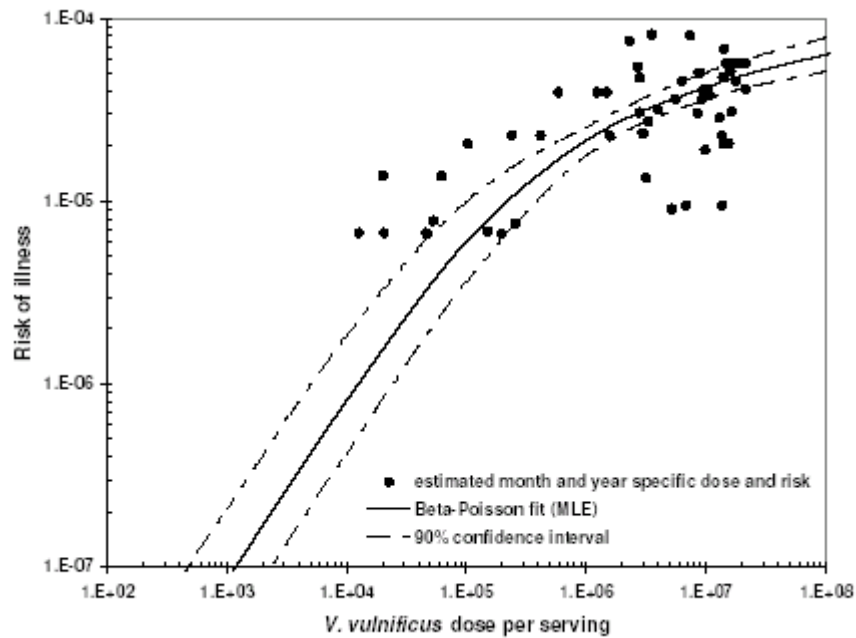
Annexe 8 : Relation dose-réponse de *V. vulnificus*

L'équation est de la forme suivante :

$$p = 1 - \left(1 + \frac{d}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

avec : p : probabilité d'avoir une septicémie
 d : dose d'exposition (quantité de vibriions ingérés) (UFC)
 α et β : constantes

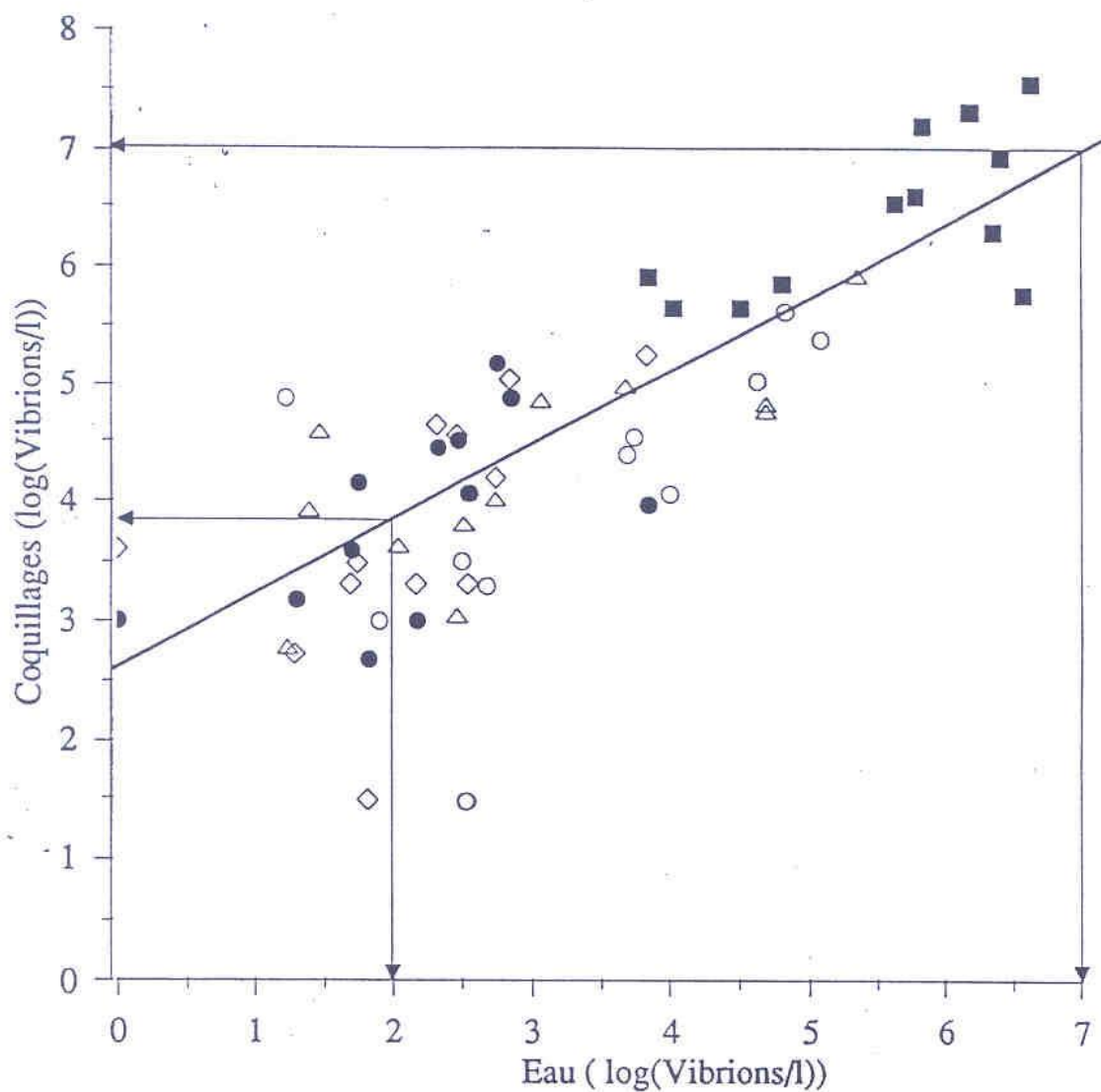
Les valeurs les plus probables pour α et β sont respectivement $9,3 \cdot 10^{-6}$ et 110 000. La courbe correspondante ainsi l'intervalle de confiance à 90 % sont représentés sur la figure suivante.



**Annexe 9 : Relation entre la concentration en vibrions dans l'eau et dans les coquillages
(moules et coques)**

Équation 1

$$\log_{10} (\text{vibrions/l})_{\text{coquillage}} = 0,633 \log_{10} (\text{vibrions/l})_{\text{eau}} + 2,523$$



- log (Vib Marck moules) vs log (Vib Marck eau)
- log (Vib AR moules) vs log (Vib AR eau)
- △— log (Vib Loon moules) vs log (Vib Loon eau)
- ◇— log (Vib Grav prise moules) vs log (Vib Grav prise eau)
- log (Vib Grav prise coques) vs log (Vib Grav prise eau)

Annexe 10 : Taux de filtration de l'eau des mollusques bivalves filtreurs

	Espèce	Température (°C)	Taux de filtration (l.h ⁻¹ .g ⁻¹)
Huître	<i>Ostrea edulis</i>	20 à 28	14,4 ± 3
Moule	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	12	7,2 ± 2,2 chez moules jeunes 1,1 chez moules adultes
		20	12,7 ± 3,8
Palourde	<i>Ruditapes aureus</i>	10	4,8
		20	7,4 ± 0,7
		25	8,3 ± 2,5
		30	3,4
	<i>Ruditapes decussatus</i>	12	2,2 ± 1,6
		20	3,8 ± 1,5
		27	3,5 ± 2,9

**Annexe 11 : Estimation de la concentration en vibrions dans les coquillages
en fonction de la température de l'eau**

➤ *V. parahaemolyticus*

$$\log(V/g) = \alpha + \beta \times T + \varepsilon \quad \text{Équation 2}$$

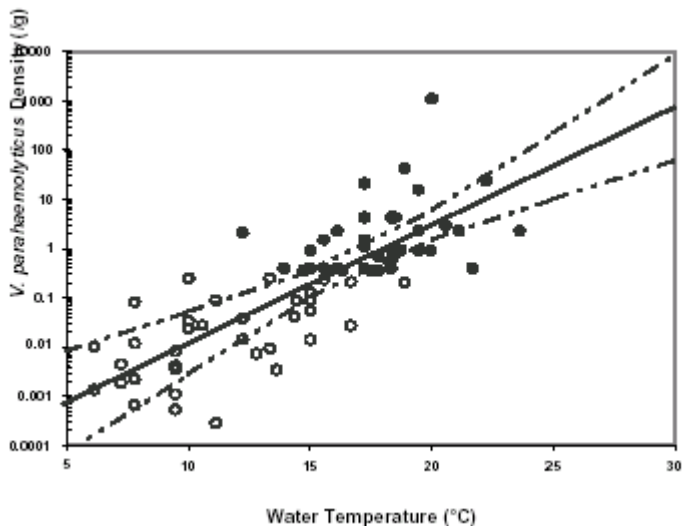
où : V : concentration en *V. parahaemolyticus* / g d'aliment

T : température de l'eau (°C)

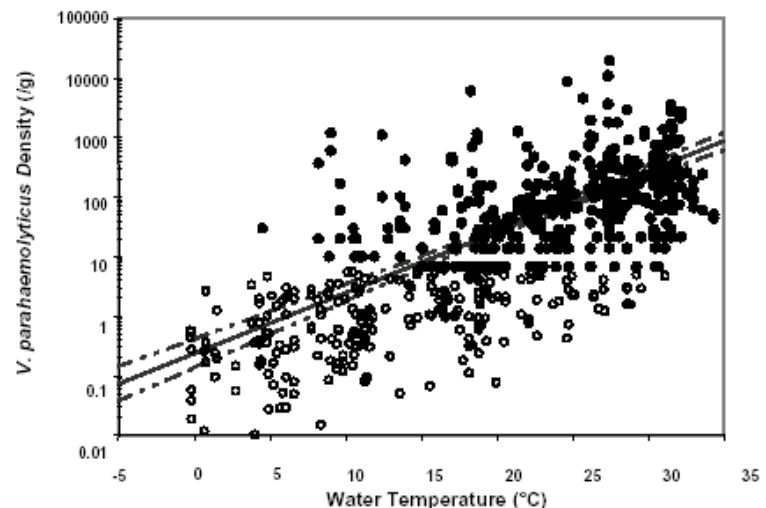
ε suit une loi normale de paramètres (0, σ^2)

α , β et σ constantes dont les valeurs sont présentées dans le tableau suivant :

	α (IC)	β (IC)	σ (IC)
Modèle 2 (WSDH)	-4.32 (-5.77,-2.88)	0.24 (0.16,0.32)	0.78 (0.61,0.99)
Modèle 3 (Cook et al.)	-0.63 (-0.87,-0.39)	0.10 (0.092,0.11)	0.76 (0.71,0.82)



Modèle 2



Modèle 3

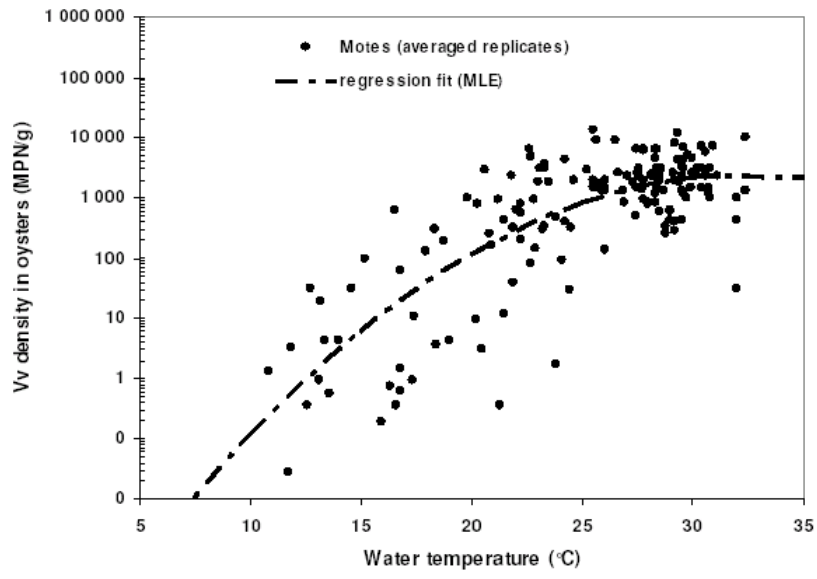
La courbe en trait plein représente l'estimation la plus probable. Les courbes en pointillés délimitent l'intervalle de confiance à 95 %.

➤ *V. vulnificus*

$$\log(V/g) = -5,66 + 0,56 \times T - 0,0086 \times T^2 + \varepsilon \quad \text{Équation 3}$$

où T : température de l'eau (°C)

ε suit une loi normale de paramètres (0 ; 0,73²)



Annexe 12 : Etudes caractérisant le pourcentage de *V. parahaemolyticus* pathogènes dans les coquillages

Source	Echantillons d'huîtres		Isolats de <i>V. parahaemolyticus</i>		Zone de prélèvement
	Quantité testée	Nombre d'huîtres pathogènes	Quantité testée	% d'isolats pathogènes	
Thompson et Vanderzant, 1976	153	?	2 218	0.18	Golfe du Mexique
Kaysner <i>et al.</i> , 1990	23	1	308	3.2	Pacifique
DePaola <i>et al.</i> , 2000	106	3	5 600	0.3	Texas
FDA/ISSC, 2000 Cook <i>et al.</i> , 2002	198	8	3 429	0.3	Golfe du Mexique et Atlantique
DePaola <i>et al.</i> , 2002	65	13	1 103	2.3	Pacifique
DePaola <i>et al.</i> , 2003	156	34	6 018 6 992	0.76 0.44	Golfe du Mexique
Kaufman <i>et al.</i> , 2003	60	13	5 159	0.18	Golfe du Mexique

Annexe 13 : Estimation de la croissance des vibrions à partir de la température de l'air

Modèle commun aux espèces *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* :

$$\log_{10} N(t) = \min \left[\log_{10} N_0 + \mu_m t, A \right] \quad \text{Équation 4}$$

Avec : N(t) : concentration en vibrions au temps t (UFC/g)

N_0 : concentration initiale en vibrions (UFC/g)

μ_m : taux de croissance maximal (\log_{10} UFC/g/h)

t : temps de stockage (h)

A : concentration maximale en vibrions (UFC/g)

La concentration maximale en vibrions est fixée à 10^6 UFC/g de chair.

➤ Pour *V. parahaemolyticus*, l'étude de Miles propose le modèle suivant :

$$\sqrt{\mu_m} = b(T - T_{\min}) \exp \left[\frac{c}{T - T_{\max}} \right] \sqrt{a_w - a_{w\min}} \exp \left[\frac{d}{a_w - a_{w\max}} \right]$$

où : μ_m : taux de croissance maximal dans le bouillon (\log_{10}/min)

T : température (K)

T_{\min} , T_{\max} : températures minimale et maximale de croissance des vibrions (K)

a_w : activité de l'eau

$a_{w\min}$, $a_{w\max}$: valeurs théoriques de l'activité minimale et maximale de l'eau

b, c, d : coefficients ajustés par la régression

Les valeurs des paramètres fixes sont données ci-dessous :

$$T_{\min} = 278,5 \text{ K (5,3°C)}$$

$$b = 0,035634$$

$$T_{\max} = 319,6 \text{ K (46,5°C)}$$

$$c = 0,34$$

$$a_{w\min} = 0,921$$

$$d = 263,64$$

$$a_{w\max} = 0,998$$

Pour s'affranchir du paramètre « activité de l'eau », sa valeur est fixée à celle correspondant à l'optimum de croissance des vibrions, soit $a_w = 0,985$, d'où l'équation :

$$\sqrt{\mu_m} = 0,035634(T - 278,5) \exp \left[\frac{0,3403}{T - 319,6} \right] 0,2488 \quad \text{Équation 5}$$

A 26 °C, ce modèle du taux de croissance donne une valeur 4 fois plus élevée que celle observée par Gooch *et al.* directement sur les huîtres. En supposant que ce comportement soit le même quelle que soit la température, on divisera alors le taux de croissance obtenu par un facteur 4.

- Pour *V. vulnificus*, les données utilisées sont celles de Cook *et al.* Elles sont rassemblées dans le tableau suivant :

	Température de stockage	Durée de stockage	Augmentation de concentration observée	Taux de croissance par heure
Cook <i>et al.</i> , 1994	18 °C	30 h	0,75 log ₁₀	0,025 log₁₀/h
Cook <i>et al.</i> , 1997	28 °C	7,5 h	1,3 log ₁₀	0,175 log₁₀/h

Le taux de croissance maximal (log₁₀/h) se calcule de la façon suivante :

$$\mu_m = \max \left[\alpha(T - T_0) \right] \quad \text{Équation 6}$$

Où : α : pente de la droite reliant le taux de croissance à la température

T : température de l'air (°C)

T₀ : température en-dessous de laquelle la croissance est inhibée (°C)

La température d'inhibition de croissance est fixée à 13 °C, selon les résultats de l'étude menée par Kaspar *et al.* (1993).

Les données de Cook *et al.* permettent de calculer α , qui vaut 0,015 h⁻¹°C⁻¹. En considérant une température minimale de 13 °C, le taux de croissance maximal peut alors être évalué en fonction de la température de stockage.

Annexe 14 : Estimation de la contamination des moules par les vibrions

➤ Concentration en vibrions dans les moules

Pour *V. cholerae*, la méthode 1 présentée au § 2.4.3 est utilisée. La concentration dans l'eau étant de $4 \cdot 10^5$ UFC/g, on en déduit d'après l'Équation 1 (Annexe 9) un taux de vibrions dans les coquillages de $1,17 \cdot 10^6$ UFC/l de moules. En considérant qu'un litre de moules (chair et liquide intervalvaire) équivaut à 300 g, la quantité de vibrions est donc de $3,9 \cdot 10^3$ UFC/g.

Pour *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*, on utilise la méthode 2, à partir de la température de l'eau. Par simplification, on considère que le paramètre ε des équations 2 et 3 (Annexe 11) est négligeable (ce qui n'est pas loin de la réalité puisque sa valeur moyenne vaut 0 et que les écarts-types sont très faibles).

➤ Concentration en vibrions pathogènes

L'ajustement est seulement réalisé pour *V. parahaemolyticus*, en considérant que 3 % des vibrions sont pathogènes.

➤ Concentration après stockage à l'air ambiant

Pour *V. parahaemolyticus*, l'Equation 5 puis l'ajustement en divisant par 4 donne un taux de croissance de $0,70 \log_{10}/h$ et $0,44 \log_{10}/h$ à 30 °C et 25 °C respectivement.

Pour *V. vulnificus*, l'Equation 6 donne un taux de croissance de $0,26 \log_{10}/h$ et $0,18 \log_{10}/h$ à 30 °C et 25 °C respectivement.

On calcule alors les quantités présentes selon l'Equation 4 (Annexe 13).