

L'ELEVAGE DE LA PALOURDE, PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE SUR LA MALADIE DE L'ANNEAU BRUN

FLASSCH J.P.¹, BARRET J.¹, MAZURIE J.¹, MAES Ph.², NICOLAS J.L.¹, NOEL T.¹,
PAILLARD C.², LE PENNEC M.²

¹ IFREMER : Laboratoire d'Aquaculture, rue de l'Ile d'Yeu, 44037 NANTES Cédex 01

² Laboratoire P.M.D.C., BP 70 29280 PLOUZANE - Laboratoire National de Recherche en Conchyliculture, Mus du Loup, 17390 LA TREMBLADE

² Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de Biologie Marine, 6 avenue Le Gorgeu 29287 BREST Cédex

RESUME : Un programme national de recherches sur la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum* a été mis en oeuvre dès 1989. Cette maladie est due à un vibrio appelé P1. Les recherches ont portées sur l'épidémiologie de terrain chez le naissain et lors du grossissement, sur la mise au point de traitements et de méthodes de dépistage simple et rapide ainsi que sur l'étude des mécanismes d'action de ce vibriion. L'analyse épidémiologique a mis en évidence une contamination préférentielle des sites par les semis, et une surinfestation horizontale secondaire. Pour remplacer le diagnostic microbiologique sur milieu de culture sélectif, une méthode immunologique est en cours de développement. Une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent l'élaboration de cet anneau permet de dire que ce phénomène n'est pas dû à une action directe du vibriion sur les cellules du manteau. Parallèlement à ces recherches, la nouvelle stratégie d'élevage proposée aux éleveurs : contrôle visuel strict du naissain par échantillonnage au moment des semis et diminution des densités, a permis de limiter l'extension de cette maladie.

Mots clés : palourde aquacole, *Ruditapes philippinarum*, vibrio, programme national

MANILA CLAM AQUACULTURE NATIONAL RESEARCH PROGRAM ON BROWN RING DISEASE

ABSTRACT : A national program started in 1989 to drive researches, on *Ruditapes philippinarum* brown ring disease corelated with a vibrio called P1. The researches have concerned epidemiological surveys on spats and adults, treatment methods, diagnostic techniques, and anatomical and functional studies about the vibrio-clam relations. The transmissions of the disease appeared mainly related to contaminated manila clam seeds, with secondary horizontal propagation. The brown ring formation appeared to be caused by a periostracum deterioration. Taking into account some of these results, an adapted cultural technique including special care of seeds and decreased densities was proposed to the farmers.

Keywords : manila clam, *Ruditapes philippinarum*, vibrio, national program

1- INTRODUCTION

L'élevage de la palourde pris son essor dans les années 1980 (FLASSCH et LE BORGNE 90) grâce à l'effort conjoint de la recherche, des régions et du domaine privé (écluseurs et éleveurs).

Deux programmes nationaux et des initiatives régionales facilitèrent la mise au point d'une zootechnie compatible avec les exigences de la production et son transfert sans heurt ; la coopération recherche-profession a permis dans ce cas de prendre conjointement en considération les éléments scientifiques (biologie générale de l'espèce, reproduction, éthologie, écologie des aires d'élevages, prédation), la part technique (structures de protection, mécanisation de l'élevage, etc...) et les données de bases économiques (bilans complets par essai de production, etc...).

Malheureusement, en fin d'année 1986, au moment où une production significative voyait le jour avec près de 500 tonnes, apparut le syndrome de l'anneau brun.

L'anneau brun s'est manifesté pour la première fois dans l'aber Benoît (Finistère Nord), sur du naissain, puis en 1987 il a été largement observé lors du grossissement dans le même secteur, sur le site de production de Brouennou.

L'anneau de couleur brune se forme sur la face interne des valves de la palourde. Cette formation est la conséquence d'une perturbation de la calcification. Elle entraîne chez les animaux en élevage des troubles de la croissance, des mortalités pouvant atteindre 100% des lots lorsque que le naissain est atteint . Elle génère par ailleurs des problèmes de commercialisation, bien que les animaux porteurs de cet anneau soient consommables, leur consommation n'ayant aucun effet préjudiciable sur la santé publique.

En fin d'année 1988, il a été prouvé par les chercheurs de l'UBO* (PAILLARD et MAES, 1990) que l'apparition de ce dépôt était d'origine pathogène, causée par la présence d'une bactérie inconnue du groupe des vibrions, présentant des caractères spécifiques. Ce vibron fut dénommé P₁.

A partir du début de l'année 1989, les travaux s'inscrivent , de lutte contre le vibron, élaboré en commun avec les équipes de l'IFREMER et de l'UBO avec le soutien scientifique et logistique de l'Institut Pasteur dans un Programme National. Ce programme de lutte contre le vibron est développé sur deux fronts, le suivi épidémiologique des zones d'élevages et les recherches spécifiques pour la lutte et la compréhension de la maladie.

Sur le terrain, les investigations sont conduites en collaboration avec les conseillers aquacoles et les laboratoires régionaux, groupes de travail qui déterminent le niveau d'infestation ainsi que l'évolution de cette épidémiologie en fonction de la période de l'année. Les résultats de ces recherches permettent de mettre en évidence les degrés de validation des protocoles proposés et de les rectifier si besoin est.

Les recherches amont sont développées à l'IFREMER et à l'UBO. Le laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade met au point des traitements aux antibiotiques, le laboratoire mollusques du Centre IFREMER de Brest, en collaboration avec l'UBO, effectue la validation d'un test immunodiagnostic qui devrait permettre non seulement d'augmenter la sensibilité du dépistage, mais aussi de diminuer le temps de réponse présence/absence du vibron. Le même laboratoire gère des expérimentations qui devraient permettre de mieux comprendre comment s'installe la maladie et sous quelles conditions zootechniques favorables.

Le laboratoire du Pr. LE PENNEC, de l'UBO effectue des recherches sur l'étude des mécanismes d'action du vibron, avec le soutien du service du Pr. DODIN de l'Institut Pasteur.

* UBO : UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

2- ORGANISATION DU PROGRAMME ET RESULTATS

La mise en oeuvre des différentes actions de recherche sur le terrain et en laboratoire a permis d'acquérir une somme d'informations qui a elle même généré une stratégie de lutte. Dès 1989 elle fut proposée à la profession, mise en pratique et affinée par la suite en fonction des résultats obtenus en laboratoire.

2.1- Epidémiologie de terrain

Dès le début 1989, une investigation est conduite sous couvert IFREMER en collaboration avec les structures de transfert mis en place par les Régions. Cette action a eu pour but de fournir des éléments d'appréciation sur l'étendue du phénomène et si possible sur l'existence de "foyers" afin de proposer à partir de la campagne 1989 une méthodologie pour mieux contrôler la prolifération de la maladie.

Le but de l'enquête préliminaire était de préciser l'ampleur du phénomène sur des animaux dont la taille est supérieure à 8 mm, seuil d'apparition de l'anneau. Les différents chaînons de la filière ont été pris en charge : nurseries, prégrossissement en claire ou sur estran, grossissement en claire ou sur estran.

Deux méthodes d'échantillonnage l'une sur le naissain, l'autre sur l'élevage en sol ont été élaborées et un protocole a été initié par les laboratoires de l'IFREMER (la Trinité, Bouin, la Tremblade, Arcachon) avec l'étroite collaboration des Conseillers Aquacoles (SMIDAP, SEMDAC)*. Au total une soixantaine d'éleveurs (nurseurs, grossisseurs) ont été sollicités, environ 80 lots étudiés et 30 000 palourdes ouvertes.

2.1.1- Le prégrossissement

- Nurseries

A part un cas où le phénomène est très marqué dans une unité recyclant en partie son eau d'élevage aucune trace significative d'anneau n'a été observée en cylindre tamis ou en claire.

Ce résultat encourageant vient du fait que les écloséries-nurseries, puis les nurseries, pour la plupart au courant du problème, ont pris les précautions sanitaires d'usage : vides sanitaires, choix des reproducteurs, etc...

- Prégrossissement

Les claires du bassin de Marennes (10 éleveurs, 30 lots) sont exemptes, dans le cadre de l'échantillonnage effectué.

Par contre dans les autres bassins, sur 24 lots échantillonnés, un cas est observé en claire relié à une nursery touchée ; sur estran, les résultats varient de 0 à 30 %, 25 % des lots entre 10 et 67 % d'anneaux. Sur des lots inférieurs à 10%, il est fréquent de trouver des poches sans anneaux réparties de part et d'autre d'une série plus marquée à quelques pour-cent (1 à 10 %). Ce cas est typique du caractère épidémiologique de ce vibrion dont la transmission se fait par contact ou par l'eau si la densité de l'inoculum est égale ou supérieure à 10⁴ bactéries par ml.

* SMIDAP : SYNDICAT MIXTE POUR LE DEVELOPPEMENT AQUACOLE EN PAYS DE LA LOIRE

SEMDAC : SOCIETE D'ECONOMIE MIXTE POUR LE DEVELOPPEMENT DE L'AQUACULTURE CHARENTAISE

2.1.2- Le grossissement

- Région Vendée – Sud-Ouest

Les contrôles effectués sur le secteur de la baie de Bourgneuf ont bien montré qu'en 1989 le phénomène a peu évolué. Les élevages sur estran se sont déroulés favorablement. Dans les claires il n'est pas remarqué de prolifération importante, toutefois, il a été observé, en début d'année 1990 des contaminations sur des lots pêchés en période hivernale et stockés à fortes densités. Les conditions climatologiques du début de saison ont dû favoriser dans une large mesure ces explosions.

Les mêmes remarques peuvent être faites pour le bassin de Marennes Oléron ou dans l'ensemble, il n'est pas observé de développement du phénomène, à l'exception de quelques cas en début d'année 1990 où des élevages apparemment sains ont déclaré la maladie après stockage à haute densité et même à des densités de stabulation en claire de 500 palourdes par m².

Les suivis effectués sur les semis de 1988 dans le bassin d'Arcachon ont permis en 1989 d'identifier un lot contaminé à plus de 25 %, et de l'éradiquer. Sur les 19 élevages examinés exhaustivement* seuls quatre lots présentaient des taux inférieurs à 5 %. Bien que l'introduction de naissains contaminés en 1988 ait eu lieu, le syndrome anneau brun ne s'est pas propagé.

- Région Bretagne

Cette partie du littoral s'avère la plus touchée. La zone des abers dans le Finistère nord ne faisant plus l'objet de production significative et étant considérée comme sinistrée, l'enquête épidémiologique porte sur la Bretagne sud.

+ Pratiques culturelles – Prophylaxie mise en oeuvre au Croisic

Dans la plupart des zones d'élevages, les professionnels ont adapté leurs pratiques aux recommandations scientifiques portant sur le contrôle de semis et la diminution des densités. Par contre, peu d'éradications ont été pratiquées.

En Baie du Croisic, une stratégie de lutte plus élaborée a été négociée entre les éleveurs et onseillers aquacoles du SMIDAP selon la démarche suivante :

- constat au printemps 89 de la contamination préférentielle en prégrossissement en poches à forte densité,
- éradication fin 1989 des lots les plus atteints (pour la plupart vendables),
- suppression des prégrossissements entre T2 et T6 au printemps 90 (avec dédommagements financés par la Région),
- contrôle de tous les semis de printemps 90 (refus d'un seul lot sur 22 présentant des anneaux),
- semis à moins de 200/m²,
- contrôle 3 mois après semis.

+ Méthode de suivi

Cette surveillance épidémiologique s'appuie sur 2 campagnes annuelles d'échantillonnage menées par le laboratoire IFREMER de la Trinité/mer, dans les principaux secteurs d'élevage : une vingtaine de semis chez une quinzaine de vénériculteurs.

* Suivis IFREMER – ARCACHON, R. ROBERT

Outre cette surveillance par échantillonnages, un contrôle exhaustif des semis de palourdes du Croisic et de Penbé (Loire-Atlantique) a été réalisé en fin 1989 et 1990, à l'initiative du SMIDAP et avec l'aide du laboratoire Pen Avel du Croisic, et de l'IFREMER.

Les gisements naturels du Morbihan font également l'objet d'un suivi des anneaux bruns depuis 1989.

Sur une parcelle donnée, la stratégie de prélèvement repose sur un échantillonnage systématique uniformément réparti : généralement 20 prélèvements de 1/22^e de m², parfois 10 prélèvements de 30 palourdes (Croisic, Pen Bé).

Les données recueillies sont les nombres totaux, nombres d'anneaux, taille ou poids, des analyses complémentaires histologiques étant réalisées sur quelques sous-échantillons.

+ Résultats

L'analyse du pourcentage des palourdes porteuses d'anneaux bruns dans les élevages fait apparaître, au-delà de l'extrême diversité des résultats (les pourcentages varient de 0 % à 70 % selon les périodes, les sites, le semis), les évolutions suivantes :

- une diminution du % d'anneaux bruns de juin-juillet 1989 à octobre-novembre 1989 (observé dans 11 semis sur 12), sans mortalité importante : ceci peut s'expliquer par la faible virulence du pathogène durant la période estivale,
- une recrudescence au printemps 1990 particulièrement nette dans les sites de Pen Bé et du Croisic (tableau 1).

% d'anneaux	SEMIS DE 1988	SEMIS DE 1989	SEMIS DE 1990	
			Stock Naturell	T6 Naissain contrôlé
Nov. 1989	2 %	13,9 %	3,2 %	
Mars 1990	-	2,6 %	0%	0 %
Mai-Juin 1990	-	37 %	22 %	< 1 %

Tableau 1 : Evolution de la maladie dans le traict du Croisic.

L'origine du demi-élevage est très suspect puisque le banc naturel s'est avéré par la suite contaminé. Le stockage avant semis a favorisé la contamination. Lors de l'immersion la maladie était latente. Il est à noter toutefois que cette recrudescence a épargné pour l'instant les semis de naissain de 1990.

Ce développement de la maladie au 1^{er} semestre 1990 concerne également les gisements naturels de palourdes japonaises du Morbihan : le gisement de Sarzeau, le plus important (production évaluée à près de 1 000 tonnes par an) indemne d'anneaux en 1989 est touché à 4,4 % en juillet 1990. Les gisements de la rivière d'Auray révèlent eux aussi la présence d'anneaux à taux faible en 1990.

CONCLUSION

La connaissance la plus précise possible des réalités de terrain a permis, dès le début 1989 de proposer aux éleveurs une stratégie de lutte qui limite au mieux la prolifération du vibron P₁ :

- contrôler impérativement le naissain avant semis, ne pas semer si le lot est touché, en tout état de cause au-dessus de 10 % l'éleveur prend de sérieux risques,
- limiter les densités et le confinement, lors du prégrossissement utiliser les normes zootechniques en vigueur (IFREMER 1988), au cours du grossissement, pratiquer une densité inférieure à 200 palourdes/m²,
- effectuer un contrôle trimestriel de l'élevage,
- éradiquer les élevages les plus touchés (impérativement ceux dont le pourcentage d'anneaux est supérieur à 20 %).

2.2- La détection du vibron "P₁"

L'obtention d'une méthode simple de détection du vibron "P₁" constitue l'étape préalable à toute étude épidémiologique.

Le dépistage rapide du pathogène est également nécessaire pour contrôler l'action des traitements entrepris sur les palourdes (naissain).

2.2.1- Détection classique

Actuellement, la détection s'effectue encore par des méthodes classiques de bactériologie. Elle utilise des caractéristiques biochimiques et de croissance du pathogène, à savoir : non utilisation du manitol et du saccharose, croissance sur TCBS et non croissance à 30°C (PAILLARD et MAES, 1990) ; la procédure comporte trois étapes et nécessite un délais de trois à quatre semaines.

Culture sur milieu différentiel

Les échantillonnages à analyser sont mis en culture sur milieu différentiel*. Une culture pure de référence du vibron P₁ est réalisée simultanément sur le même milieu. Après 7 jours d'incubation à température ambiante, les colonies "suspectes", c'est à dire les colonies vertes et d'aspect comparable aux colonies de P₁ de la culture de référence sont repiquées trois fois sur milieu Zobell pour purification.

Pré-tests

Après purification, les souches choisies sont testées sur milieu TCBS et sur ZOBELL incubé à 30°C. Les souches qui forment des colonies vertes sur TCBS, et ne poussant pas à 30°C sont retenues, toutes les autres sont éliminées.

Passage en galerie d'identification

Seules les souches retenues à la suite des deux étapes précédentes (souches Man -, Sac -, TCBS+, tuées à 30°C) sont passées en galeries d'identification (Api 20B et 20E). P₁ est diagnostiqué lorsqu'il y a identité du profil obtenu avec celui du vibron P₁.

* (ZOBELL ADDITIONNE DE MANITOL ET BLEU DE BROMOTHYMOL)

2.2.2- Méthodes immunologiques

Des méthodes immunologiques de détection sont également envisagées : le test d'agglutination et des tests de type ELISA sur filtre ou sur plaque de microtitration.

- Test d'agglutination

Ce test nécessite l'isolement et la purification des souches suspectes. Il ne permet pas de traiter un grand nombre d'échantillons, ni de mesurer des concentrations du vibron P₁. Son seul avantage est qu'il permet de reconnaître P₁ plus rapidement que par la technique des galeries d'identification Api.

- Test ELISA sur filtre

Les essais réalisés jusqu'à présent montrent que le test ELISA sur filtre donne de nombreuses réponses faussement positives. Des anticorps plus spécifiques seront donc nécessaires pour la mise en oeuvre de ce test.

- Test ELISA sur plaque de microtitration

Les méthodes bactériologiques pour repérer le vibron P₁ sont lourdes et peu sensibles. Elles sont par contre sûres. Il est évident que si nous disposions d'une méthode plus sensible, rapide et peu coûteuse les voies de transmission de la maladie seraient mieux connues et l'épidémiologie facilitée. Des mesures prophylactiques plus précoces pourraient être prises pour éviter son extension.

Nous avons travaillé sur une méthode ELISA appelée immunométrique. Elle est assez lourde à mettre en oeuvre mais pourrait être simplifiée. L'anticorps contre le P₁ dont nous disposions a été produit chez le lapin en inoculant la bactérie totale. Cet anticorps polyclonal est donc dirigé contre de multiples antigènes. Cependant les essais d'agglutination sur lame du vibron P₁ sont positifs et il n'y a pas d'agglutination avec d'autres vibrions proches. Ce qui montre que les anticorps dominants sont assez spécifiques. Les IgG ont été purifiées sur DEAE et lyophilisées.

La méthode comporte les étapes suivantes :

- sensibilisation des plaques de microtitration par 10⁵ ou 10⁶ P₁ formolés par ml distribués dans les cupules,
- mise en contact simultanément de l'anticorps et de l'échantillon (eau intervalvaire plus grattage du bord du manteau) à analyser,
- saturation des sites par de la BSA,
- lavage,
- distribution dans les cupules de l'échantillon,
- lavage,
- distribution des anticorps marqués à la peroxydase,
- lavage,
- réaction enzymatique.

Durée de l'opération 28 heures.

Les résultats montrent qu'on distingue les palourdes saines et malades (figure 1).

A partir de 10^5 UFC/ml absorbé lors de l'étape 1

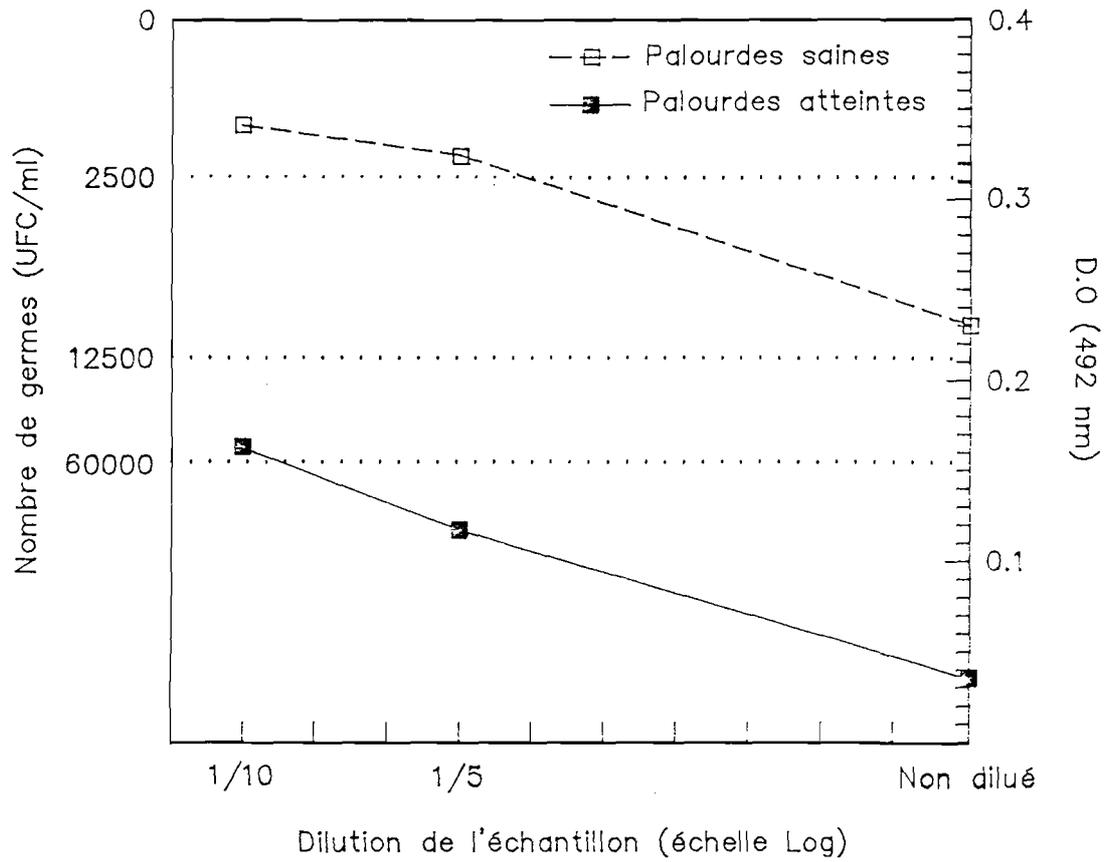


Figure 1: Résultat d'un test Elisa immunométrique.

Des palourdes japonaises provenant du site de Brouenou ont donné une réaction positive alors que les palourdes européennes ne donnaient rien. Les anneaux bruns ne sont apparus que plusieurs mois après sur ces palourdes japonaises après l'introduction à proximité par un professionnel de palourdes d'origine naturelle contaminées.

Curieusement des palourdes japonaises provenant d'Irlande où la maladie est absente donnaient une réaction positive.

Nous envisageons donc de faire un nombre significatif de tests sur des palourdes saines et malades pour le valider en faisant en parallèle des recherches bactériologiques.

Si la présence de vibron P₁ en quantité importante se confirme en l'absence de tout symptôme :

- les mesures prophylactiques à prendre seront plus draconiennes,
- les conditions du développement de l'anneau brun pourront être étudiées avec précision.

Cette méthode va être améliorée en couplant l'enzyme directement sur l'anticorps spécifique, en testant une méthode sandwich, enfin en purifiant l'antigène membranaire qui donne cette spécificité et en produisant des anticorps monoclonaux.

La détection du vibrio est une étape fondamentale dans la connaissance de l'évolution de la maladie dans les milieux d'élevage (eau de mer et sédiment), et dans les mollusques. Une méthode rapide et sensible permettrait d'affiner la stratégie de lutte. Cette démarche devrait être néanmoins accompagnée de traitements efficaces.

2.3- Les traitements possibles

2.3.1- Epidémiologie "contrôlée"

Une expérience de traitement du sédiment lors de l'élevage de la palourde est effectuée dans la zone très sensible des Abers (Bretagne nord) sur le site de Broennou reconnu comme point de départ de la propagation de l'anneau brun. Cette expérience a aussi pour but d'observer très précisément la contamination en fonction des traitements.

Un parc de protection verticale a été construit sur l'estran, au coefficient d'émergence de 55-60, dans lequel, 15 parcelles de 24 m² ont été délimitées par des bandes de filet enfouies sur 0,2 m ; chaque parcelle étant distante d'1 m de ses voisines.

Les palourdes (*Ruditapes philippinarum*) issues d'un demi-élevage suspect lors du contrôle ont été traitées préventivement pendant 24 h par baignade dans une solution d'antibiotique - Furazolidone à 10 mg/litre - avant leur transfert. Un test visuel a confirmé l'absence d'anneau brun. Chaque traitement (Tabl. 2) a été appliqué sur 3 replicas.

LOTS	DENSITE au m ²	TRAITEMENT
F 1, 2, 3	150	0 (faible densité)
T 1, 2, 3	250	0 (Témoin)
C 1, 2, 3	250	Chaux vive avant le semis (3 T/ha)
A ₁ 1, 2, 3	250	Antiseptique* 1 fois par mois

* SOLUTION DE 80 ppm d'AGROSEPTIL DISPERSEE A RAISON DE 2 l/m²

Tableau 2 : Les traitements appliqués

Les paramètres suivis sont :

- la croissance, le pourcentage d'anneau brun (bimensuel)
- la survie (point intermédiaire et final).

L'analyse des résultats de croissance, ne montre pas de différence au niveau des traitements. L'apparition des premiers anneaux bruns, avec remontée de certains individus, correspond à la fin de la saison estivale et à la baisse de température.

Il ne peut être affirmé que le semis de lots atteints, stockés, transportés et implantés dans des concessions voisines soit responsable de l'apparition de ces anneaux car d'autres concessions plus éloignées en cours d'élevage comportaient des palourdes atteintes, mais ce transfert intempestif est néanmoins suspect.

Il est difficile compte tenu de cet incident de savoir si cette contamination est due à l'effet site ou directement attribuable aux élevages suspects. Dans l'attente des résultats finaux de cette expérience, il est difficile d'affirmer que l'un de ces traitements a eu un effet sur l'apparition des anneaux.

Le tableau 3 donne les résultats acquis fin octobre 1990, la fin de l'expérience et le bilan étant programmés pour la fin décembre 90.

DATES	29.03.90			25.04.90			22.06.90			21.08.90			20.09.90	17.10.90		
Opération	SEMIS			ECHANTIL.			ECHANTIL.			ECHANTIL.			SURVIE	ECHANTIL.		
LOT	P	L	A.B.	P	L	A.B.	P	L	A.B.	P	L	A.B.	%	P	L	A.B.
	(g)	(mm)	%													
F ₁	5,1	27,3	0	5,5	28,2	0	8,7	32,1	0	11,7	36,2	0	87	13,2	37,3	20
F ₂	5,1	27,3	0	5,3	28,2	0	8,9	32,8	0	11,8	36,6	0	85	13,9	37,7	21
F ₃	5,1	27,3	0	5,2	28,1	0	8,6	32,7	0	12,1	36,7	0	92	13,9	37,3	25
T ₁	5,1	27,3	0	5,5	28,2	0	8,6	32,9	0	12,4..	37,0	0	90	14,5	38,5	18
T ₂	5,1	27,3	0	5,5	28,2	0	8,7	32,6	0	12,2	36,6	0	87	13,9	37,6	15
T ₃	5,1	7,3	0	5,5	28,2	0	8,8	32,8	0	12,1	36,7	0	81	13,4	37,3	13
C ₁	5,1	27,3	0	5,5	28,1	0	8,7	32,1	0	11,7	36,2	0	92	14,6	38,7	18
C ₂	5,1	27,3	0	5,4	28,3	0	8,4	32,3	0	12,6	37,3	0	83	14,2	37,0	19
C ₃	5,1	27,3	0	5,7	28,8	0	8,6	32,8	0	12,9	37,2	0	96	14,3	37,5	21
A ₁₁	5,1	27,3	0	5,5	28,2	0	8,6	32,6	0	12,0	35,8	0	98	13,5	37,7	26
A ₁₂	5,1	27,3	0	5,5	28,3	0	8,6	32,3	0	12,1	36,6	0	93	13,1	36,3	24
A ₁₃	5,1	27,3	0	5,5	28,3	0	8,4	32,7	0	12,3	36,6	0	87	14,5	37,6	22
A ₂₁	5,1	27,3	0	5,4	28,2	0	9,0	33,3	0	12,1	36,3	0	86	14,7	38,8	13
A ₂₂	5,1	27,3	0	5,3	28,2	0	8,8	33,1	0	12,0	36,3	0	90	13,5	37,7	19
A ₂₃	5,1	27,3	0	5,5	28,3	0	8,9	32,9	0	12,5	36,9	0	94	13,8	37,7	19

Tableau 3 : Résultats, croissance (poids (P), longueur (L) et pourcentage d'anneaux bruns (A.B.), (échantillon de 100 individus par lot).

2.3.2- Actions des antibiotiques

La recherche d'une thérapie a été entreprise dans un but prophylactique permettant d'assurer la mise sur le marché de jeunes palourdes exemptes de vibriion P₁ à leur sortie de nurserie. Six antiseptiques et trois antibiotiques : Aquamosulf (Trimethoprim + Sulfadimidin - Natrium), Furazolidone et Flumequine* ont été testés *in vitro* et *in vivo*.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices *in vitro* (CMI), ainsi que les tests de toxicité *in vivo* ont permis de sélectionner uniquement les 3 antibiotiques.

Des essais de désinfection ont permis ensuite de tester les doses (5, 10, 20, 40 mg/l) et les durées de traitement (1, 2, 3 jours). Un traitement : la furazolidone à la concentration de 10 mg/l durant 3 jours a donné les meilleurs résultats.

Une dernière expérience (Tableau 4) a permis de tester l'efficacité de la furazolidone vis-à-vis du vibriion P₁. L'isolement et la caractérisation de cette bactérie ont été entrepris selon la procédure décrite par PAILLARD et MAES (1990). Le traitement semble être efficace sur l'ensemble de la population bactérienne qui diminue très sensiblement et en particulier sur le vibriion P₁ dont aucune colonie n'est retrouvée chez les animaux traités.

		Nbre de bactéries par g de palourde	1ère sélection Nbre de colonies isolées / Nbre de palourdes	2ème sélection Nbre de colonies isolées / Nbre de palourdes	Identification Nbre de colonies de Vibriion P ₁ / Nbre de palourdes
T E M O I N	25 palourdes avec anneau brun	1,2 x 10 ⁷	141 / 25	37 / 19	21 / 13
	25 palourdes sans anneau brun		126 / 25	32 / 15	8 / 5
T R A I T E S	25 palourdes avec anneau brun	5,9 x 10 ⁵	96 / 25	6 / 6	0
	25 palourdes sans anneau brun		86 / 25	7 / 6	0

	25 PALOURDES AVEC ANNEAU BRUN		25 PALOURDES SANS ANNEAU BRUN	
NOMBRE DE PALOURDES AVEC VIBRIO P ₁	13 palourdes	52 %	5 palourdes	< 20 %

Tableau 4 : Nombre total de bactéries et de vibriion P₁ après traitement à la furazolidone.

* CONCERNANT LE TRAITEMENT A LA FLUMEQUINE, IFREMER N'EST PAS PROPRIETAIRE DES RESULTATS ET C'EST A LA SOCIETE PHARMACEUTIQUE 3M DE LES DIFFUSER ET D'EFFECTUER LES DEMARCHES POUR UNE MISE SUR LE MARCHE DU PRODUIT SI ELLE LE DESIRE.

Cependant la comparaison des résultats du témoin présentant ou non les signes cliniques de la maladie (anneau brun) fait apparaître le diagnostic du vibrio dans 20 % des cas chez les "palourdes saines" contre 52 % chez les "palourdes malades" (tableau 4). Cette observation révèle, d'une part, les limites de sensibilité à la technique de détection, puisque dans les 48 % de cas positifs par observation macroscopique le vibrio n'est pas retrouvé, et, d'autre part, souligne le manque de connaissances sur la biologie et l'épidémiologie de cette bactérie.

Ces études ont donc permis de mettre au point une méthode de traitement et il convient maintenant de tester ce traitement à une plus grande échelle et y adapter la méthodologie.

2.4- Mécanisme de la formation de l'anneau brun : données préliminaires

L'observation macroscopique de palourdes montre qu'une dizaine de jours après une contamination expérimentale par du P₁, il apparaît des taches brunes sur le bord interne de la coquille. Trois semaines après l'injection, un des stades observés majoritairement, montre des taches brunes s'étalant tout le long d'une zone située entre l'intersection palléale et le bord de la coquille, formant un anneau brun léger. Au bout d'un mois, l'anneau brun apparaît plus épais et nettement visible chez 50 % des palourdes, les autres présentent des stades intermédiaires, plus légers.

Des coupes histologiques décalcifiées ont été réalisées afin d'observer la relation entre les tissus durs et les tissus mous. Chez une palourde saine, le périostracum sécrété par le manteau se dépose sur le bord de la coquille. Par contre, chez une palourde malade le périostracum, dès sa sortie du sillon périostracal, devient hétérogène, s'épaissit puis s'accumule et forme le dépôt brun. Ce dépôt de matériel organique est localisé entre l'insertion palléale et le bord de la coquille. Des colorations histochimiques (PAS, Bleu Algian, Gordon & Swiss pour la réticuline) ont été réalisées. Aucune différence réellement marquante entre les palourdes saines et malades n'a pu être mise en évidence.

L'observation au microscope électronique à balayage montre que douze heures après l'injection de vibron P₁, les palourdes présentent des amas de bactéries sur le périostracum, depuis la sortie du sillon périostracal jusqu'au bord de la coquille. Elles y semblent fortement accrochées par de fines expansions orientées vers la lame périostracale. Cette propriété d'adhésion, est bien connue chez les pathogènes humains comme *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus* qui adhèrent spécifiquement aux cellules de la muqueuse intestinale au moyen de "pilis" (Yamamoto et Yokota, 1988, 1989). Le pouvoir pathogène de ces germes est d'ailleurs étroitement lié à leur capacité à se fixer spécifiquement sur certaines cellules (Yoshio *et al.*, 1981). Dans le cas de la maladie de l'anneau brun, la pathogénicité du Vibrio P₁ est vraisemblablement liée à son affinité pour le périostracum, et sa tendance à se fixer.

Le Vibrio P₁, lorsqu'il adhère au périostracum, peut émettre des toxines, ou en dégrader préférentiellement l'un des composés, dérégulant le fonctionnement normal de l'élaboration coquillière.

CONCLUSION

L'étude épidémiologique de la maladie des anneaux bruns, montre que la contamination est favorisée par :

- les conditions climatologiques (15–18°C),
- les fortes densités lors du prégrossissement ou du grossissement,
- le stockage et les manipulations en milieu confiné.

Il a aussi été largement observé que la transmission horizontale est peu intense, mais qu'elle peut être favorisée par l'augmentation de la densité et les conditions climatologiques optimales (15–18°C).

L'étude du Vibriion permet de faire les remarques suivantes :

- cette bactérie supporte des salinités variées de 0,5 à 47 pour mille,
- elle est thermosensible, capable de vivre à 5°C, mais sans se développer, et elle meurt à 30°C,
- son développement est lié à l'importance de l'inoculum en eau de mer, à 10⁶ vibrions/ml la contamination est rapide, en dessous de 10⁵/ml elle est faible et aléatoire,
- la dose de contamination par individus est de l'ordre de 10³, 10⁴ P₁, ce qui revient à dire que le facteur densité notamment lors du stockage favorise la contamination à fortiori lorsque les températures sont optimales (15–18°C).
- Le vibriion P₁ est sensible au moins à deux antibiotiques, la furazolidone et la flumequine.

Ces résultats, très variés, sont obtenus grâce à cette approche globale, intégrée et faisant appel à plusieurs disciplines. La méthodologie utilisée a permis de faire face à une nouvelle pathologie. En effet, il n'est pas observé d'action directe de la bactérie sur les cellules, la lame périostrociale à l'origine de la calcification peut se développer normalement. Elle est modifiée que lorsqu'elle est recouverte de bactéries. Deux hypothèses sont avancées : soit la bactérie modifie directement la biochimie de la calcification, soit celle-ci est modifiée par la palourde pour mieux lutter contre le vibrio.

Ces études ont permis de faire les recommandations prophylactiques aux professionnels et aux administrations, propositions qui, si elles ne permettent pas la disparition complète de la maladie, offrent toutefois la possibilité de la contrôler et de limiter considérablement son impact.

FLASSCH J.P. et Y. LE BORGNE, 1990. Introduction in Europe, from 1972 to 1980 of the nipponese manila clam, *Tapes philippinarum* and the effects on the aquaculture production and natural settlements. CANADA WAS 90. in press. 9 p.

IFREMER, 1988. La palourde, dossier d'élevage. IFREMER pub. 106 p.

PAILLARD C., L.PERCELET, M. LE PENNEC et D. LE PICARD, 1989. Origine pathogène de l'"anneau brun" chez *Tapes philippinarum* (Mollusque bivalve). C.R.Acad. Sci. Paris, t 309, série 3, pp 235–241.

PAILLARD C. et Ph. MAES, 1990. Ethologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* : pathogénicité d'un vibrio sp. C.R.Acad. Sci. Paris, t 310, série 3, pp 15–20.

YOSHIO I., Y. HIROAKI and S. SUMIO, 1981. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* and its relation to pathogenicity. Can. J. Microbiol. 27, pp 1252–1259.

YAMAMOTO T. and T.YOKOTA, 1988. Electron microscopy study of *Vibrio cholera* 01 adherence to the mucus coat and villus surface in the human small intestins. Infection and Immunity. 56(10), pp 2753–2759.

YAMAMOTO T. and T.YOKOTA, 1989. Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestins. Infection and Immunity. 57(8), pp 2410–2419.