

EFFET DU *VIBRIO P1*, PATHOGENE DE *RUDITAPES PHILIPPINARUM*, SUR D'AUTRES ESPECES DE BIVALVES

MAES P. et PAILLARD C.

*Laboratoire de Biologie Marine, Université de Bretagne Occidentale, Faculté des Sciences,
29287 BREST Cédex.*

RESUME : *Vibrio P1*, le responsable de la maladie de l'anneau brun (MAB) chez la palourde *Ruditapes philippinarum*, a été observé chez d'autres espèces de bivalves dont des Veneridae et des Pectinidae. En revanche chez la Moule *Mytilus edulis* et les huîtres élevées *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, le symptôme MAB n'a encore jamais été signalé et la recherche de la bactérie P1 s'est révélée négative. Par ailleurs, des contaminations expérimentales de bivalves d'intérêt aquacole avec *Vibrio P1* ont montré une sensibilité de la palourde européenne *Ruditapes decussatus* au pathogène ; cette sensibilité semble toutefois moins élevée que celle de *Ruditapes philippinarum*.

Mots clés : *Vibrio P1*, pathologie, mollusques bivalves

EFFECT OF *VIBRIO P1*, PATHOGEN OF *RUDITAPES PHILIPPINARUM* ON VARIOUS SPECIES OF BIVALVES

ABSTRACT : *The symptom which characterize the Brown Ring Disease (BRD) in Manilla clam Ruditapes philippinarum has been observed in other Bivalvia species (Veneridae and Pectinidae). Vibrio P1, the responsible of the BRD in R.philippinarum, has been detected in other Veneridae which were carrying the symptom. In mussel and oysters which are cultivated in Europe, the symptom has never been reported and Vibrio P1 has not been detected. Experimental contaminations of bivalves of commercial interest with the pathogen showed a clear Vibrio P1 sensitivity of european clam Ruditapes decussatus ; this later seems however to be less sensitive than the Manilla clam.*

Keywords : *Vibrio P1*, pathology, bivalve molluscs

INTRODUCTION

La Maladie de l'Anneau Brun (MAB) de la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum* se caractérise par le développement d'un dépôt de matériel organique de pigmentation brune, sur la face interne des valves (Paillard et al 1989). Cette maladie, associée à des mortalités élevées dans les élevages, est provoquée par un *Vibrio* sp. appelé "P1" (Paillard et Maes 1990a). Un symptôme similaire à l'anneau brun, mais induit par d'autres causes a déjà été signalé chez d'autres bivalves. Chez la palourde *Venerupis aurea*, il est provoqué par le trématode *Meiogymnophalus fossarum* (Bartoli 1974); chez deux pectinidae, *Patinopecten yessoensis* et *Argopecten irradians*, il serait dû à des conditions stressantes d'élevage (Mori 1975, Palmer 1980).

Deux approches ont été suivies dans la présente étude, afin de déterminer si *Vibrio P1* pouvait également être tenu responsable du développement de l'anneau brun ou de symptômes semblables à ce dernier, chez d'autres espèces de bivalves. La première approche a consisté à rechercher ce pathogène chez des spécimens de diverses espèces présentant l'anneau brun dans le milieu naturel (ou sur parc). Dans la deuxième approche, plus expérimentale, une contamination de différentes espèces de bivalves avec *Vibrio P1* a été effectuée, pour étudier plus directement l'effet du pathogène sur ces espèces.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique : Des spécimens adultes de palourdes malades ont été récoltés, soit dans des parcs d'élevage (*Ruditapes philippinarum*), soit à proximité de sites d'élevage touchés par la maladie (*Ruditapes decussatus* et *Venerupis aurea*), soit par draguage en mer, sur des sites éloignés des zones d'élevage (*Tapes rhomboïdes*). Des juvéniles malades de *R. philippinarum* et *R. decussatus* provenant d'écloseries ont également fait l'objet d'analyses. Les coquilles St Jacques (*Pecten maximus*), porteuses du symptôme ou non, ont été produites en écloserie expérimentale au centre IFREMER-BREST et prégrossies en casiers immergés en mer. Les bivalves sains utilisés pour les contaminations expérimentales étaient des juvéniles provenant de diverses écloseries ou des adultes dans le cas de *Cerastoderma edule*.

Expérience de contamination : Une suspension de *Vibrio P1* dans de l'eau de mer stérile ajustée optiquement à une concentration de 10^8 cellules/ml a été introduite dans la cavité palléale au moyen d'une seringue munie d'une courte aiguille, en veillant à ne pas léser les tissus, à raison de 0.1 ml/individu pour les espèces *R. philippinarum*, *R. decussatus* et *Mercenaria mercenaria* et de 0.5 ml/individu pour *P. maximus* et *C. edule*. Les bivalves ont ensuite été laissés à sec pendant trois heures. Les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* difficilement injectables en raison de leur petite taille ont été contaminées par balnéation dans la suspension bactérienne diluée au dixième. *P. maximus*, supportant mal l'émersion prolongée, a également subi la balnéation en plus de l'injection. Toutes ces expériences ont porté sur des groupes de 40 à 50 individus.

Détection de *Vibrio P1* : La chair et l'eau intervalvaire des bivalves ont été récupérés et pesés dans un récipient stérile. Après addition d'une quantité connue d'eau de mer stérile, l'ensemble a été broyé à l'ultraturax. Des dilutions appropriées des broyats ont été ensemencées sur un milieu différentiel: milieu de Zobell additionné de Mannitol (1 %) et de Bleu de Bromothymol (milieu ZMB). Une culture de référence de *Vibrio P1* a été réalisée simultanément sur ZMB. Après 5 à 7 jours d'incubation à 20°C, les colonies vertes (mannitol -) et d'aspect comparable à celles de la culture de référence ont été sélectionnées et purifiées. Leur croissance a ensuite été testée sur milieu TCBS (AES) et à 30°C sur Zobell. Ces tests préliminaires (ou "prétests") ont permis d'écarter les souches présentant un caractère les distinguant de *Vibrio P1*. Seules les souches dont les caractéristiques correspondaient à celles du *Vibrio* pathogène (Mannitol -, poussant sur TCBS, Saccharose - et ne poussant pas à 30°C) ont été retenues et passées en galerie d'identification Api 20 B et 20 E. Leur profil phénotypique a été comparé à celui de *Vibrio P1* décrit par Paillard et Maes (1990 a).

RESULTATS

1. Observation du symptôme et détection du pathogène.

Le symptôme qui caractérise la MAB de la palourde japonaise, *R. philippinarum* (Fig 1), a été observé en France chez plusieurs espèces de palourdes indigènes (Fig 2 et 3). Assez fréquent chez *R. decussatus*, il

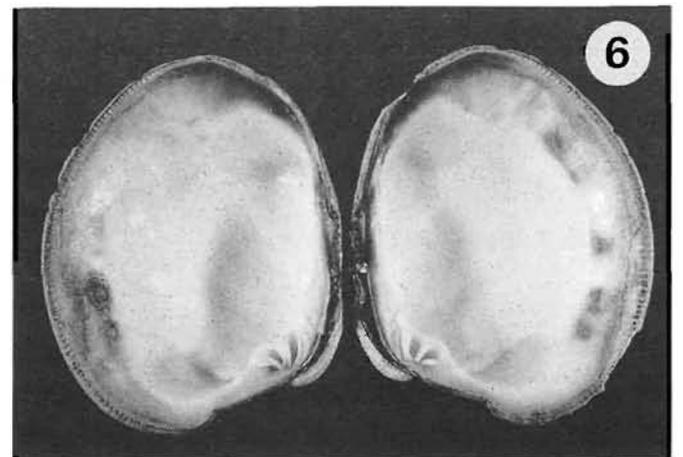
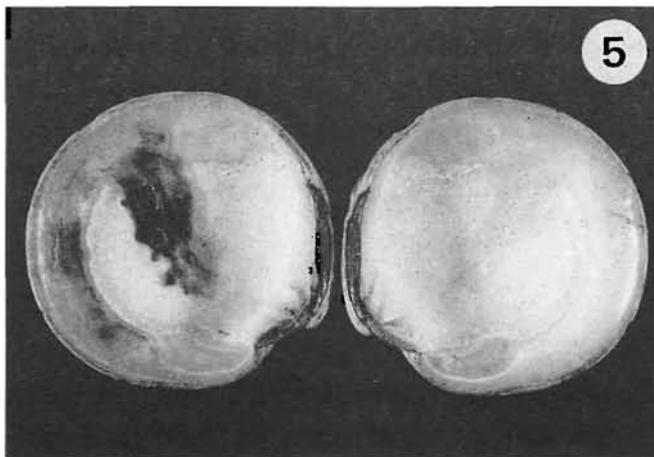
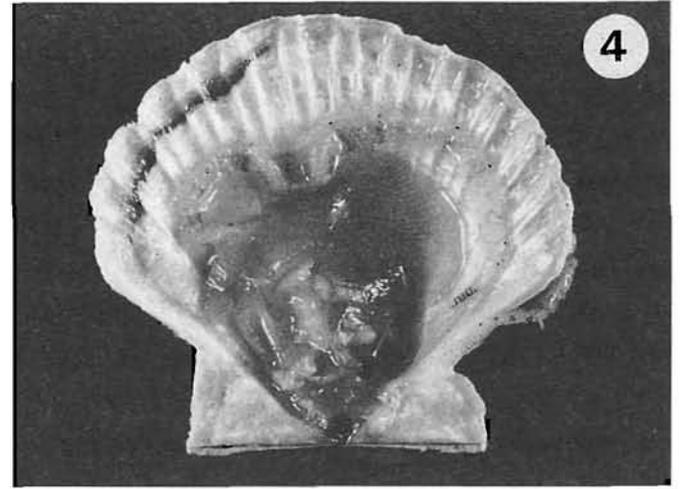
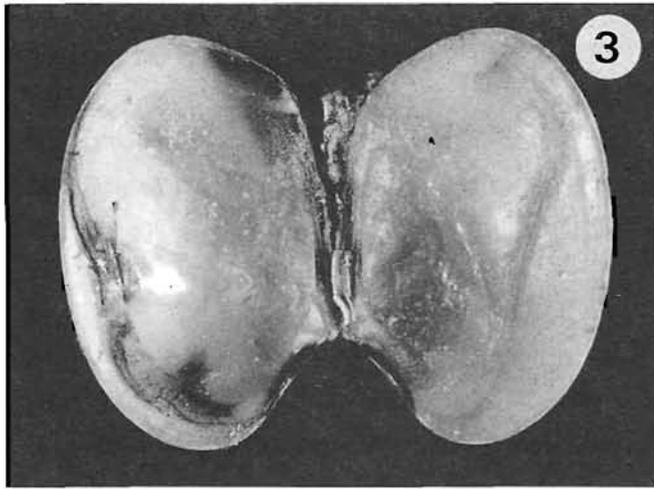
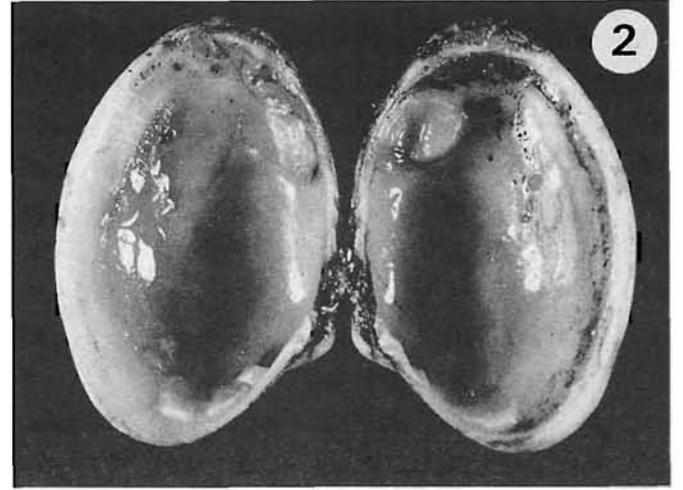
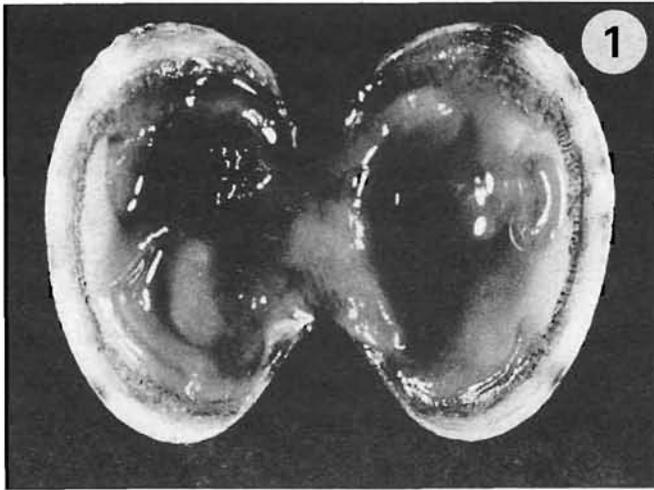


Fig. 1 à 6 Symptôme anneau brun observé chez diverses espèces de bivalves. 1 : *Ruditapes philippinarum*, 2 : *Venerupis aurea*, 3 : *Ruditapes decussatus*, 4 : *Pecten maximus*, 5 : *Dosinia exoleta*, 6 : *Mercenaria mercenaria*

est plus occasionnel chez *V. aurea*, *T. rhomboïdes*. Il a également été découvert chez d'autres veneridae, chez un exemplaire de *M. mercenaria* (Fig 6) de *Dosinia exoleta* (Fig 5). Un dépôt brun semblable a pu être également constaté chez plusieurs spécimens de Coquilles Saint-Jacques, *P. maximus* (fig 4). Jusqu'à présent, le symptôme n'a pas été signalé chez d'autres bivalves d'intérêt commercial comme la Pinaire (*Venus verrucosa*), la Moule (*M. edulis*), ou chez les huîtres élevées en Europe (*O. edulis* et *C. gigas*).

Vibrio P1 a été détecté chez la palourde japonaise *R. philippinarum* et chez deux espèces de palourdes indigènes, *R. decussatus* et *V. aurea*, chez des individus présentant l'anneau brun (tableau 1). Il n'a pas été retrouvé chez *T. rhomboides* ni chez *P. maximus*. Aucune analyse n'a été effectuée sur *M. mercenaria* et *D. exoleta*.

TABLEAU 1

Détection de *Vibrio P1* chez différentes espèces de bivalves récoltées dans la nature ou sur parc et présentant un anneau brun.

Espèces	<i>Vibrio P1</i>
<i>Ruditapes philippinarum</i>	+
<i>Ruditapes decussatus</i>	+
<i>Venerupis aurea</i>	+
<i>Tapes rhomboides</i>	-
<i>Mercenaria mercenaria</i>	/
<i>Dosinia exoleta</i>	/
<i>Pecten maximus</i>	-

+: P1 détecté; -: P1 non détecté; /: pas d'analyse.

2. Infections expérimentales (tableau 2).

L'injection de *Vibrio P1* aux deux espèces de palourdes, *R. philippinarum* et *R. decussatus* a donné des taux d'individus porteurs d'un anneau brun, respectivement de 52% et 17%, quinze jours après

l'injection et de 98% et 62% après quatre semaines. Dans les deux cas, les témoins sont restés indemnes. Parmi les autres espèces de bivalves infectés, seule la Coquille Saint-Jacques a développé le symptôme, avec une prévalence de 30% , valeur non significativement différente de celle de 16 % atteinte en fin d'expérience dans le groupe d'individus témoins non infectés expérimentalement.

TABLEAU 2

Prevalence du symptôme AB chez des bivalves contaminés expérimentalement par *Vibrio Pl*.

Espèces	15 jours	30 jours	Témoins
<i>Ruditapes philippinarum</i>	52%	98%	0%
<i>Ruditapes decussatus</i>	17%	62%	0%
<i>Mercenaria mercenaria</i>	0%	0%	0%
<i>Crassostrea gigas</i>	/	0%	0%
<i>Ostrea edulis</i>	/	0%	0%
<i>Pecten maximus</i>	/	30%	16%
<i>Cerastoderma edule</i>	/	0%	0%

DISCUSSION

Les données histo-pathologiques préliminaires montrent que l'anneau brun est essentiellement constitué d'un dépôt de périostracum qui se forme suite à une dégradation de la lame périostracale par *Vibrio Pl* (Paillard et Maes 1990b). Tout facteur exogène, biotique ou non, susceptible de détériorer la lame périostracale risque donc de provoquer ce même symptôme. De tel facteurs ont déjà été étudiés ou évoqués comme causes possibles d'anomalies coquillières diverses chez les bivalves, anomalies incluant le symptôme anneau brun. Un parasite, le trématode *Meiogymnophallus fossarum*, dont les métacercaires sont localisées au niveau du bourrelet palléal (région où est produite la lame périostracale) de la palourde *Venerupis aurea*, provoque un symptôme très semblable à l'anneau brun chez cette espèce (Bartoli, 1974). Mori (1975) a obtenu des déformations coquillaires et un dépôt similaire à l'anneau brun chez un pectinidae d'élevage, *Patinopecten yessoensis* , en plaçant les bivalves dans des

conditions qu'il juge stressantes, à savoir, en conditions oligotrophes. De plus, il semble faire augmenter la prévalence du symptôme, en faisant subir des chocs et des vibrations aux bivalves, par agitation quotidienne des casiers d'élevage. D'après Palmer (1980), des déformations marginales des valves et la production d'un dépôt brun peuvent être induites en laboratoire chez *Argopecten irradians* suite à une manipulation excessive des bivalves. Pour expliquer ses observations, cet auteur invoque la délicatesse du processus d'élaboration de la coquille et la facilité avec laquelle ce processus peut être perturbé par des circonstances ou des facteurs stressants, pouvant conduire à des rétractions répétées du manteau ou à une irritation locale de ce dernier.

Au vu de ces cas de parasitisme (Bartoli 1974) ou de situations stressantes (Mori 1975, Palmer 1980) pouvant induire la formation de symptômes de type anneau bruns, il apparaît que l'infection par *Vibrio* P1 ne doit pas être considérée comme **condition unique et nécessaire** au développement d'un anneau brun chez un bivalve. Ce *Vibrio* apparaît cependant comme **élément suffisant** pour provoquer la Maladie de l'Anneau Brun chez au moins trois espèces de palourdes, *R. philippinarum*, *R. decussatus* et *V. aurea*, et probablement aussi chez *T. rhomboides*. En effet, le pathogène a été mis en évidence chez des spécimens malades de ces trois espèces (il n'a pas été retrouvé chez *T. rhomboides*). De plus, injecté soit directement à *R. philippinarum* et *R. decussatus*, soit sous forme de broyat de palourdes malades à *V. aurea* et *T. rhomboides* (Paillard et al. 1989), il provoque des taux élevés d'anneau bruns chez toutes ces palourdes. Les deux espèces testées dans la présente étude (*R. philippinarum* et *R. decussatus*) présentent des degrés différents de sensibilité au pathogène. En conditions expérimentales, la prévalence des anneaux bruns chez *R. decussatus* est d'environ 35% inférieure à celle observée dans les mêmes conditions chez *R. philippinarum*. Ce résultat est confirmé par des observations réalisées dans les zones vénériques. Jusqu'à présent, sur le terrain, la palourde "européenne" développe moins d'anneaux bruns que la "japonaise". De même, dans les bancs naturels de palourdes indigènes, les cas de maladie sont très rares. Aucun élément ne permet actuellement d'expliquer les raisons de la différence de sensibilité de ces deux espèces au *Vibrio* pathogène.

Chez le Clam, *M. mercenaria*, espèce d'intérêt commercial, le symptôme de l'anneau brun a été observé mais n'a pu être produit expérimentalement

par injection de *Vibrio* P1. Chez un autre veneridae, *D. exoleta*, le symptôme a également été observé, mais cette espèce n'a fait l'objet d'aucune expérience de contamination. L'étiologie du symptôme observé chez ces deux veneridae n'est donc pas déterminée. Elle n'est pas clairement établie non plus dans le cas de la Coquille St Jacques. En effet, le pathogène n'a pas été détecté chez *P. maximus* et l'expérience de contamination n'a pas donné lieu à une prévalence d'anneaux bruns significative par rapport aux témoins. La contamination, qui n'a pas été réalisée dans les meilleures conditions, les bivalves n'étant probablement pas indemnes avant l'expérience, ne permet donc pas de conclure quant à l'éventuel rôle pathogène de *Vibrio* P1 pour ce pectinidae. Chez d'autres bivalves d'intérêt commercial comme la Praire, la Moule, les Huîtres, la Coque, des anneaux bruns n'ont pas été signalés jusqu'à présent. D'autre part, les expériences de contamination menées sur la Coque, *Cerastoderma edule*, et sur de jeunes Huîtres, *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, montrent que ces espèces ne sont pas sensibles au pathogène.

BARTOLI, 1974. Recherche sur les Gymnophallidae F. N. Morozov, 1955 (Digenea), parasites d'oiseaux des côtes de Camargue : Systématique, biologie et écologie. **Thèse, Univ. Aix-Marseille.**

MORI, 1975. Seasonal variation in physiological activity of Scallops under culture in the coastal waters of Sanriku district, Japan and a physiological approach of a possible cause of their mass mortality. **Bull. Mar. Biol. Asamushi Tohoku Univ. 15 : 59-79.**

PAILLARD C, PERCELEY L, LE PENNEC M et LE PICARD D, 1989. Origine pathogène de l'"anneau brun" chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, Bivalve). **C. R. Acad. Sci. Paris, 309 : 235-241.**

PAILLARD C et P. MAES, 1990a. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *vibrio* sp. **C. R. Acad. Sci. Paris, 310 : 15-20.**

PAILLARD C and P MAES, 1990b. The brown ring disease in *Tapes philippinarum*: adherence of the *Vibrio* P1 strain to the periostracum. **Acta of the 4th Congress of Pathology in marine Aquaculture, Vigo, Spain: 20-21.**

PALMER, 1980. Observation on shell deformities, ultrastructure and increament formation in the bay scallo *Argopecten irradians*. **Mar. Biol., 58 : 15-23.**