

Parasitologie

DÉPISTAGE DE LA MALADIE DE L'ANNEAU BRUN CHEZ DES ESPÈCES DE BIVALVES DES CÔTES TUNISIENNES

par

Monia EL BOUR¹, Ferdaous JAAFAR-KEFI², Mouna HAMROUNI¹,
Naima MAHMOUDI¹, Mohammed DELLALI², Najoua TRIGUI EL MENIF²
et Nejla ALOUI-BEJAOUI³

La maladie de l'anneau brun, altération de la coquille susceptible d'affecter différentes espèces de palourdes, a été incriminée parmi les causes de mortalité de populations de ce bivalve dans différents pays en Méditerranée. Sa prospection a été réalisée chez différentes espèces de bivalves (*Cerastoderma glaucum*, *Pecten glaber*, *Donax trunculus* et *Lithophaga lithophaga*) prélevées dans différents sites côtiers en Tunisie pendant la période 2005-2006. Les résultats obtenus ont révélé la présence de symptômes similaires à ceux de la maladie décrits pour des espèces de bivalves sur les côtes Nord Méditerranéennes. Les prévalences obtenues sont variables d'une espèce à une autre (comprises entre 10% et 90%). Des analyses bactériologiques ont été menées en vue de détecter l'agent *bactérien causal éventuel* (*Vibrio* P1 ou *Vibrio tapetis*) par le biais de tests cultureux et biochimiques. Les résultats ont révélé la présence de vibrios proches du *V. tapetis* (profils biochimiques proches). Cependant, les travaux d'infestations expérimentales restent à mener en vue de confirmer la virulence de ces pathogènes, de même que leur identification moléculaire approfondie permettra d'approcher leurs rôles respectifs chez les différentes espèces de bivalves prospectées.

Detection of the brown ring disease in bivalve species from Tunisian coasts

Brown ring disease (BRD) of bivalves is characterized by an abnormal brown deposit of organic nature, which generally adheres in the inner face of the valves, usually between the pallial line and the edge of the shell, forming a brown ring. This disease was first extensively described in various clam species in different Mediterranean countries and found to be responsible for severe mortalities in these areas. BRD has since been described in other bivalve species. Despite the wide distribution of bivalve species along the Tunisian coasts,

Bulletin de la Société zoologique de France 133 (1-3)

no attention was given to problem of disturbance of bivalve species here. In the present study we report the prospecting results of the BRD realized for different bivalves species (*Cerastoderma glaucum*, *Pecten glaber*, *Donax trunculus* and *Lithophaga lithophaga*) from different costal areas in Tunisia. The results obtained showed that the symptoms were similar to those of BRD in the northern Mediterranean, with variable prevalence rates (from 10% to 90%) obtained for the several species examined. The highest prevalence was noted for the species *Pecten glaber* and *Lithophaga lithophaga* with, respectively, 90% and 80% of the animals observed being infested. Since the main causative agent of the BRD was identified as *Vibrio* sp. (called *Vibrio* P1) and named *Vibrio tapetis*, bacteriological methods were used to eventual isolation of the pathogen. These methods included cultural and biochemical tests.

The results of the bacteriological analyses revealed the presence of *Vibrio* close to *V. tapetis* (biochemical profiles similar to those of *V. tapetis*), mainly from infected *Lithophaga lithophaga* and *Donax trunculus*. Nevertheless, field and experimental studies remained to be done to confirm the virulence of bacteria isolated. In this respect, molecular identification tools should provide more information about their role in the different species of bivalves.

Introduction

Parmi les déformations coquillières touchant les bivalves, la maladie de l'anneau brun caractérisée par un dépôt de conchyoline brunâtre tapissant l'intérieur des valves est la plus décrite notamment chez *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis aurea* et *Tapes rhomboides* (revue in PAILLARD *et al.*, 2004). Cette maladie a été aussi observée chez d'autres espèces de *Veneridae* et de *Pectinidae* par MAES *et al.* (1992). Récemment, des symptômes similaires ont été décrites par HUCHETTE *et al.* (2006) chez l'orveau (*Haliotis tuberculata*). En Tunisie, rares sont les études qui se sont intéressées à cette pathologie des bivalves. Des malformations coquillières ont été signalées chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (GIMAZANE, 1997), la palourde *Ruditapes decussatus* (identifiée comme la maladie de l'anneau brun) par EL BOUR *et al.* (2002), la datte de mer *Lithophaga lithophaga* (JAAFAR *et al.*, 2004) et la praire *Venus verrucosa* (TRIGUI EL MENIF *et al.*, 2005).

La présente étude identifie des altérations coquillières similaires au MAB chez d'autres espèces de bivalves : *Cerastoderma glaucum*, *Lithophaga lithophaga*, *Pecten glaber* et *Donax trunculus*.

Matériel et Méthodes

Sites de prélèvements

Les prélèvements de différents types de bivalves analysés ont été effectués respectivement pour *Pecten glaber*, *Lithophaga lithophaga*, *Donax trunculus* et *Cerastoderma glaucum* au niveau de la lagune de Bizerte, baie de Bizerte, golfe de Tunis et golfe de Gabès (Fig. 1).

La datte de mer *Lithophaga lithophaga* ainsi que *Donax trunculus*, ont été échantillonnés en été 2005 alors que pour *Pecten glaber* et *Cerastoderma glaucum* l'échantillonnage a été réalisé au printemps 2006.

Maladie de l'anneau brun

Paramètres étudiés

Pour tous les prélèvements effectués, les différents types d'analyses sont pratiqués durant les 24 heures suivant la récolte sur terrain.

Détermination du taux de mortalité

Ce taux est déterminé selon que les valves de l'individu examiné sont ouvertes ou entrouvertes à la pression manuelle externe exercée sur la coquille.

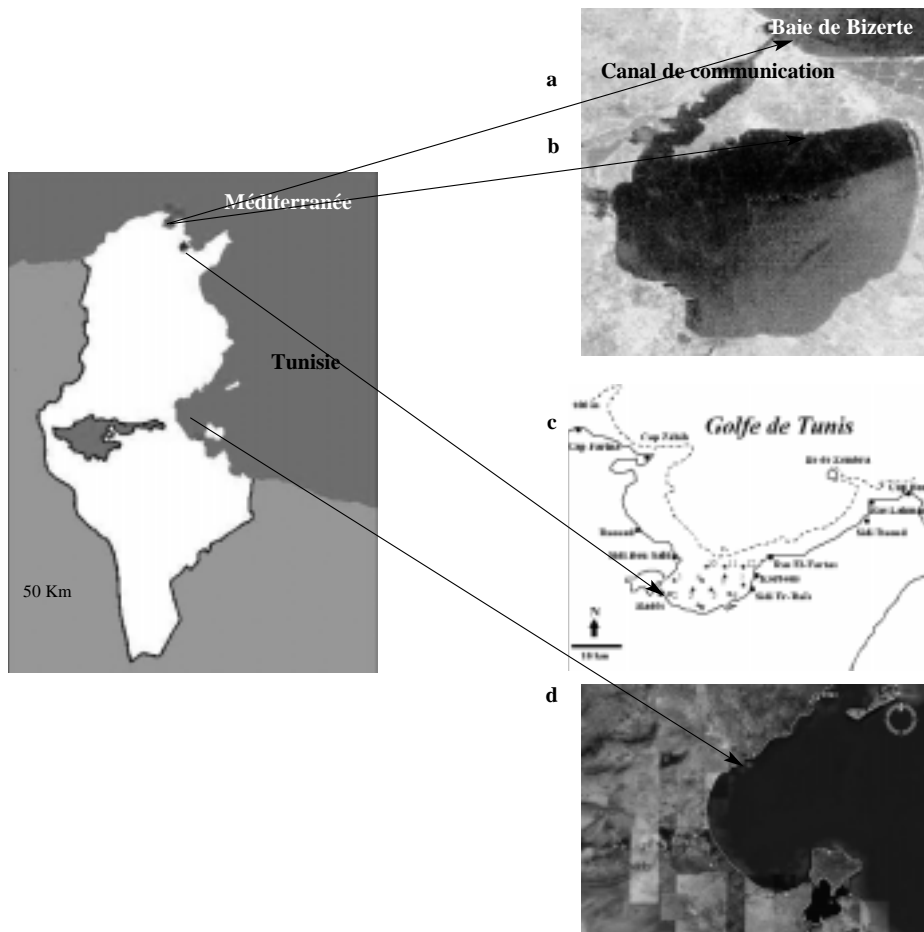


Figure 1

Stations de prélèvement des bivalves : (a) *L. lithophaga* dans la baie de Bizerte ; (b) *P. glaber* dans la lagune de Bizerte ; (c) *D. trunculus* dans le golfe de Tunis ; (d) *C. glaucum* dans le golfe de Gabès.

Sampling sites of the bivalves: (a) *L. lithophaga* in Bizerte Bay; (b) *P. glaber* in the Bizerte lagoon; (c) *D. trunculus* in the Gulf of Tunis and *C. glaucum* in the Gulf of Gabès.

Détermination de la présence et/ou fréquence en anneau brun

Le diagnostic repose sur la détection d'un dépôt organique brunâtre adhérent à la surface interne des valves (généralement visible à l'œil nu). Ainsi, les individus examinés ne sont comptés malades que s'ils présentent un dépôt bien caractéristique sur l'une ou les deux valves.

Numération bactérienne

Pour chaque prélèvement, nous avons procédé aux dénombrements de la charge mésophile totale et de la charge en *Vibrionaceae* totaux, en utilisant respectivement les milieux de culture : Zobell agar (ZA) et Zobell mannitol agar (ZMA). Ces analyses ont été réalisées sur différents compartiments des espèces de bivalves examinés : fluides extra palléaux et le broyat de la chair des bivalves.

La technique des réplicats de PAILLARD *et al.* (1990) ainsi que les tests morphologiques (coloration de Gram), culturels (types de colonies poussant sur milieux ZA et ZMA) et biochimiques [catalase, oxydase, sensibilité à l'agent vibriostatique (O129), tests Api 20 E] ont été utilisés pour la recherche et l'identification de vibrio pathogène (notamment *V. tapetis*). La souche de *V. tapetis* (CECT 4600), en provenance du laboratoire de l'IUEM-UBO à Brest a été utilisée pour des fins d'identification des isolats bactériens.

Résultats

Selon les espèces prospectées, nous avons remarqué que :

- pour *Lithophaga lithophaga* : l'échantillon prélevé au niveau de la baie de Bizerte (en été 2005) a présenté une fréquence de 80 % de taches brunes. Chez les individus infestés, ces taches sont apparentes sur toute la face interne des valves aussi bien sur la face externe qui est en contact direct avec la matrice calcaire du sédiment (Fig. 2). Les analyses bactériennes effectuées ont montré des charges bactériennes en *Vibrionaceae* totaux de l'ordre de 6.10^6 ufc/mg de matière fraîche (Tableau 1).

L'identification spécifique des isolats bactériens effectués a révélé la présence d'au moins une souche (SL 2) dont les caractéristiques biochimiques sont similaires à celles de *V. tapetis* (agent bactérien causal de la maladie de l'anneau brun chez la palourde) (Tableau 2) ;



Figure 2

Dépôts bruns sur les faces internes des valves de datte de mer (*Lithophaga lithophaga*).
Brown deposit on the inner faces of the valves of *Lithophaga lithophaga*.

Maladie de l'anneau brun

Tableau 1

Fréquence de la tache brune et distribution des charges en bactéries pathogènes chez les différentes espèces de bivalves prospectées.

Frequencies of the brown deposit and distribution of bacterial pathogen load for the different bivalve species investigated.

Différentes espèces	Fréquence de la tache brune (en %)	Charges en <i>Vibrionaceae</i> pathogènes	
		Liquide extrapalléal (ufc*/ml)	Broyat de la chair (ufc*/mg de chair)
<i>Lithophaga lithophaga</i> (n=100)	80 %	6 10 ⁶	6 10 ⁶
<i>Pecten glaber</i> (n=50)	90 %	1 10 ⁷	4 10 ⁷
<i>Donax trunculus</i> (n=100)	10 %	2 10 ⁵	7 10 ⁵
<i>Cerastoderma glaucum</i> (n=50)	32 %	–	7 10 ⁷

* ufc : unité formant colonies.

• **pour *Pecten glaber*** : les prélèvements en provenance de la lagune de Bizerte montrent des taches brunes à un taux de 90 %. Ces taches sont apparentes au niveau de la face interne des valves, notamment dans la zone centrale (Fig. 3). Les résultats de dénombrements ont montré des taux très élevés en *Vibrionaceae* pathogènes de l'ordre de 1.10⁷ufc/ml dans le liquide extra palléal et 4.10⁷ufc/mg de matière fraîche (Tableau 1). Ces charges élevées ont été obtenues pour une température de 17,4°C dans les eaux de prélèvement. Cependant, nous n'avons pas pu isoler d'espèces proches de *Vibrio tapetis* ;

• **pour *Donax trunculus*** : les prélèvements effectués en provenance des zones du golfe de Tunis et ont montré la présence de taches brunes sur la face interne des valves avec une prévalence de 10 % (Fig. 4). Les charges en bactéries pathogènes dénombrées sont de l'ordre de 2 à 7.10⁵ ufc/mg de matière fraîche. Là encore, les isolats bactériens identifiés font apparaître des profils biochimiques très proches de celui du *V. tapetis* (CECT 4600) (Tableau 2) ;



Figure 3

Dépôts bruns sur les faces internes de valves de pétoncle (*Pecten glaber*).

Brown deposits on the inner faces of the valves of Pecten glaber.

Tableau 2

Identification biochimique des différents isolats bactériens effectués chez *L. lithophaga* et *D. trunculus*.
Biochemical identification of the different bacteria isolated from L. lithophaga and D. trunculus

Souches/Usists	ONPG	ADH	LDC	ODC	Cit	H2S	Ure	UDA	IND	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mel	Amy	Arg	Ox	Cat	O129
<i>V. fapsis</i> CECT4600	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	\$
<i>S.L1 (L. lithophaga)</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	N.F	N.F
<i>S.L2 (L. lithophaga)</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	N.F	N.F
<i>S.L3 (L. lithophaga)</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	N.F	N.F
<i>S.L4 (L. lithophaga)</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	N.F	N.F
<i>S.D1 (D. trunculus)</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	N.F	N.F
<i>S.D2 (D. trunculus)</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Legende: (+): positive reaction; (-): negative reaction; (N.F): non fait; (ONPG): beta-galactosidase; (ADH): arginine dihydrolase; (LDC): lysine decarboxylase; (ODC): ornithine decarboxylase; (Cit): citrate utilization; (H2S): H2S production; (URE): Urease production; (TDA): tryptophane desaminase; (IND): Indole production; (VP): acetoin production; (Gel): gelatinase production; (Glu): fermentation of Glucose; (Man): fermentation of Mannitol; (Ino): fermentation of Inositol; (Sor): fermentation of Sorbitol; (Rha): fermentation of Rhamnose; (Sac): fermentation of Arabinose; (Ox): cytochrome oxydase production; O129 : Agent vibriostatique.

Maladie de l'anneau brun

• pour *Cerastoderma glaucum* : les résultats obtenus font apparaître la présence de taches brunes sur le pourtour des valves de la coquille avec une prévalence de 32 %. Ces taches sont similaires dans leur localisation à celles observées au niveau de la coquille de *Ruditapes decussatus* portant la maladie de l'anneau brun. La charge en *Vibrionaceae* pathogènes est très importante, de l'ordre de 7.10^7 ufc/mg de matière fraîche, toutefois, nous n'avons pas isolé de bactéries de l'espèce *V. tapetis* ou d'espèces proches.

Discussion

La maladie de l'anneau brun (MAB) initialement décrite par PAILLARD *et al.* (1989) chez la palourde d'élevage *R. philippinarum*, puis chez d'autres espèces de bivalves, se caractérise par le développement d'un dépôt de matériel organique de pigmentation brune sur la face interne des valves. En Tunisie, la première signalisation fut chez le bivalve *R. decussatus* récoltées dans les sites naturels côtiers à des prévalences variables d'une région à une autre (EL BOUR *et al.*, 2002). La présente étude décrit les résultats d'observations d'altérations coquillières similaires à la MAB chez d'autres espèces de bivalves (*L. lithophaga*, *P. glaber*, *D. trunculus* et *C. glaucum*). Les résultats obtenus montrent que c'est la datte de mer *L. lithophaga* et le pétoncle *P. glaber* qui présentent les prévalences les plus élevées. Pour des charges en bactéries pathogènes élevées notées pour les deux espèces, c'est seulement au niveau de la datte de mer que nous avons détecté la présence de bactéries proches du *V. tapetis* (agent bactérien causal de la MAB chez la palourde). Néanmoins, chez le haricot de mer (*D. trunculus*) bien que la prévalence de la MAB été faible (10%), nous avons identifié des bactéries proches de *V. tapetis*.

Il est à noter que parmi toutes ces espèces, c'est *L. lithophaga*, qui vit incrustée dans un sédiment calcaire auquel l'animal s'ajuste par toute la surface coquillière et qui serait plus exposée à l'effet pathogène des bactéries. Chez ce bivalve, trois types d'altérations périostracales provoquées par des parasites ont été déjà décrits par JAAFAR *et al.* (2004). Pour l'une de ces altérations, la présence du côté externe de la coquille de tâche rugueuse brunâtre rappelant celle de la MAB.

Alors que l'étude de PAILLARD *et al.* (1990) démontrait que l'anneau brun ou le dépôt de périostracum chez la palourde se forme suite à la dégradation par la bactérie *V. tapetis*, il a été avancé que d'autres facteurs exogènes biotiques ou non seraient susceptibles de détériorer la lame périostracale, et risquant de provoquer les mêmes symptômes que ceux de l'infestation bactérienne.

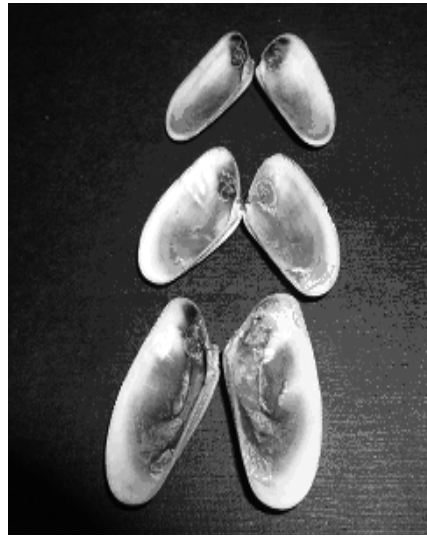


Figure 4

Dépôts bruns sur les faces internes de valves de haricots de mer (*Donax trunculus*) prélevés dans le golfe de Tunis.

Brown deposits on the inner faces of the valves of Donax trunculus from the Gulf of Tunis.

Bulletin de la Société zoologique de France 133 (1-3)

Ainsi, chez *V. aurea*, BARTOLI *et al.* (1974) ont décrit que le trématode *Meiogymnophalus fossarus* pouvait induire les mêmes symptômes que la MAB. Chez deux *Pectinidae* : *Patinopecten yessoensis* et *Argopecten irradians* des dépôts similaires à l'anneau brun ont été obtenus suite à des conditions stressantes oligotrophes infligées à l'animal, selon respectivement MORI *et al.* (1975) et PALMER *et al.* (1980).

Par ailleurs, les travaux de MAES *et al.* (1992) portant sur des contaminations expérimentales de bivalves d'intérêt aquacole avec le *Vibrio tapetis* ont montré des sensibilités variables chez les différentes espèces. Ainsi, l'infestation expérimentale de la coque (*Cerastoderma edule*) et des huîtres (*Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*) est sans effet sur ces animaux et aucun signe de la MAB n'est apparu. Il en découle que la présence du pathogène chez des espèces de bivalves ne serait pas la condition suffisante pour l'apparition de la MAB.

Conclusion

Des symptômes similaires à ceux de la maladie de l'anneau brun de la palourde se présentent avec des prévalences variables chez des espèces de bivalves de la côte tunisienne (*L. lithophaga*, *P. glaber*, *D. trunculus* et *C. glaucum*). Des bactéries de profils biochimiques proches du *Vibrio tapetis* ont été isolées notamment chez la datte de mer (*L. lithophaga*) et le haricot de mer (*D. trunculus*). Cependant, les symptômes du MAB observés ne semblent pas être induits par ces bactéries vu que d'autres facteurs exogènes (parasites ou autres) peuvent induire de tels symptômes. Plusieurs approches seraient possibles, notamment les infestations expérimentales ciblées par différents types de pathogènes, en vue de déceler l'apparition de tels types de symptômes chez les bivalves.

Laboratoire où la recherche a été effectuée

Laboratoire de Pathologie des organismes aquatiques
INSTM, rue du 2 mars 1934, 2025 Salammbô, Tunisie.

1. Institut National des Sciences et Technologie de la Mer, Laboratoire de Pathologie.
2. Faculté des Sciences de Bizerte,
Laboratoire de Bio-surveillance de l'Environnement.
3. Institut National Agronomique de Tunis. Département Halieutique.
Email : monia.elbour@instm.rnrt.tn

RÉFÉRENCES

- 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.
- EI BOUR, M., ATTIA, H., PAILLARD, C., MRAOUNA, R., AYARI, W. & EL ABED, A. (2002).- Étude de dépistage de la maladie de l'anneau brun et détermination des germes bactériens associés chez la palourde (*Tapes decussatus*) des côtes tunisiennes. *Bull. INSTM*, **7**, 56-59.

Maladie de l'anneau brun

- GIMAZANE, J.P. (1977).- Note sur la malformation de la coquille de la moule dans le lac de Bizerte. Premiers résultats. *Bull. Off. Natn. Pêche*, **3**, 99-108.
- HUCHETTE, S., PAILLARD, C., CLAVIER, J. & DAY, R. (2006).- Shell disease : abnormal conchiolin deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 267-271.
- JAAFAR, F., TRIGUI EL-MENIF, N., LE PENNEC, M. & BOUMAIZA, M. (2004).- Perturbations coquillières chez le mollusque bivalve *Lithophaga lithophaga* dans la baie de Bizerte (Tunisie). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **129** (4), 419-426.
- MAES, P. & PAILLARD, C. (1992).- Effet du *Vibrio* P1 pathogène de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves. IFREMER, *Actes de Colloques*, **14**, 141-148.
- 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. & LE PICARD, D. (1989).- Origine pathogène de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, Bivalve). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **309**, 59-79.
- PAILLARD, C. & MAES, P. (1990).- 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.
- PAILLARD, C., LE ROUX, F. & BORREGO, J.J. (2004).- Bacterial disease in marine bivalves. A review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living. Ressour.*, **17**, 477-498.
- PALMER (1980).- Observation on shell deformities, ultrastructure and increment formation in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Biol.*, **58**, 15-23.
- TRIGUI EL-MENIF, N., GUEZZI, Y., LE PENNEC, M., BOUMAIZA, M. & LE PENNEC G. (2005).- Infestation of the clam *Venus verrucosa* by *Sipunculoidea* and the lithophagous bivalve, *Gastroch dubia*. *Acta Adriatica*, **46**, 83-90.

(reçu le 23/03/07 ; accepté le 27/08/07)

