

# Aspects histopathologiques associés à l'infection du loup et de la daurade par *Vibrio alginolyticus*

Histopathological sights associated with *Vibrio alginolyticus* infection of sea bass and gilt-head sea bream

Amel Ben Kahla-Nakbi <sup>1\*</sup>, Hédia Lachkar-Kacem <sup>2</sup>, Noura Elmnasser <sup>1</sup>, Jihène Cheriaa <sup>1</sup>, Amina Bakhrouf <sup>1</sup>

1. Laboratoire Analyse et Contrôle des Polluants Chimiques et Microbiologiques de l'Environnement, Faculté de Pharmacie de Monastir, Rue Avicenne, 5000 Monastir - Tunisie
2. Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine de Monastir, Rue Fattouma Bourghiba, 5000 Monastir - Tunisie

\* Correspondant : nakbi\_amel@yahoo.fr

## Abstract

Ben Kahla-Nakbi A., H. Lachkar-Kacem, N. Elmnasser, J. Cheriaa, A. Bakhrouf – [Histopathological sights associated with *Vibrio alginolyticus* infection of sea bass and gilt-head sea bream]. *Mar. Life*, 16 (1-2): 31-36.

*Vibrio* strains are frequently involved in epizootic outbreaks in cultured fish in aquaculture centers, causing fish mortality and serious economic loss. In this study we have isolated *Vibrio alginolyticus* that has been responsible for high mortality in a Tunisian aquaculture center. The diseased fishes showed the following symptoms: septicemia, hemorrhaging and ulcers on the skin surface. Our histological study showed gradual degradation of the muscle tissue as well as necrosis, liquefaction and digestion of the cells. Heart and liver showed cellular necrosis and lymphocyte infiltration.

### KEY-WORDS:

*Vibrio*, fish, histology.

## Résumé

Ben Kahla-Nakbi A., H. Lachkar-Kacem, N. Elmnasser, J. Cheriaa, A. Bakhrouf – Aspects histopathologiques associés à l'infection du loup et de la daurade par *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Life*, 16 (1-2) : 31-36.

Dans ce travail, nous avons étudié les aspects histopathologiques associés à une vibriose déclarée dans un centre tunisien d'aquaculture. Le germe responsable est *Vibrio alginolyticus* qui a touché des loups et des daurades dans la phase de prégrossissement. Les poissons atteints montrent des nécroses congestives au niveau des flancs, aboutissant à des ulcères profonds. Chez les daurades, les signes cliniques sont plus accentués, le poisson peut perdre la moitié de la partie céphalique.

Des coupes histologiques réalisées au niveau des muscles ulcéreux, du foie, de la rate et du cœur montrent des aspects comparables chez le loup et la daurade. Le schéma général est une nécrose cellulaire, une infiltration lymphocytaire et une hémorragie intense.

### MOTS CLÉS :

Vibriose, aquaculture marine, histopathologie.

## Introduction

Le loup (*Dicentrarchus labrax*) et la daurade (*Sparus aurata*) sont deux poissons à valeur économique importante. Plusieurs pathologies menacent l'élevage de ces deux espèces, les vibrioses constituent l'une des pathologies qui causent une mortalité importante et des pertes économiques énormes (Vera *et al.*, 1991 ; Amaro *et al.*, 1992 ; Bakhrouf *et al.*, 1992 ; Balebona *et al.*, 1998 a).

*Vibrio anguillarum* a été considéré longtemps comme le principal agent de la vibriose. Sa répartition est mondiale et n'épargne aucune espèce de poissons (Anderson, Conroy, 1970 ; Egidius, 1987). Cependant et durant la dernière décennie, *Vibrio alginolyticus* a émergé et bien que cette espèce ait été rarement incriminée comme cause de pathologie chez les poissons (Frerichs, Roberts, 1989), elle a été isolée dans les centres d'aquaculture méditerranéens (Bakhrouf *et al.*, 1992 ; 1995 ; Balebona *et al.*, 1998 a ; 1998 b). Cette espèce est pathogène opportuniste aussi bien pour l'homme en engendrant des intoxications alimentaires importantes, que pour les poissons.

Dans ce travail, nous avons isolé au mois de novembre 2001, une souche de *V. alginolyticus* qui a causé une mortalité massive chez le loup et la daurade dans la phase de prégrossissement. Le germe a été caractérisé biochimiquement, et des coupes histologiques au niveau de différents organes des poissons malades ont été réalisées pour voir l'aspect des tissus chez les deux poissons.

## Matériel et méthodes

### 1. Echantillonnage et isolement des souches

Les poissons, loup (*Dicentrarchus labrax* L.) et daurade (*Sparus aurata* L.), sont élevés dans des bassins de type race-ways (salinité de 40 PSU, température de l'ordre de 15-18°C) dans une ferme aquacole localisée sur la côte tunisienne. Les prélèvements ont été faits dans les bassins où la pathologie a été signalée. Cinq spécimens ont été examinés pour chaque prélèvement. Les poissons moribonds ont été choisis.

Des échantillons du foie, rate, cœur et des lésions externes des poissons malades sont ensemencés sur milieu Trypto caseine soja agar additionné de 1% Na Cl (qt/v) (TSA 1%) et sur milieu thiosulphate-citrate-bile-sucrose TCBS (milieu sélectif des *Vibrionaceae*). L'incubation a été faite à 22°C pendant 24-72 h. Les milieux montrant une culture pure sont sélectionnés pour

identification. La confirmation de la pureté des souches est réalisée par repiquage sur le même milieu du premier isolement.

### 2. Identification des germes

La caractérisation des souches obtenues a été faite selon la procédure décrite dans *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, Holt, 1984). Une micro méthode standardisée, galerie Api 20E (Bio-Mérieux) a été aussi utilisée.

### 3. Techniques histologiques

Pour caractériser les aspects histopathologiques liés à la vibriose, des coupes histologiques ont été réalisées au niveau des organes des poissons moribonds et comparées à celles des poissons sains.

Les organes prélevés ont été fixés dans le liquide de Bouin pendant 18 à 20 h puis déshydratés dans des bains successifs d'alcool-toluène. Les échantillons déshydratés ont été inclus dans la paraffine et colorés avec hématoxyline-éosine (HE), hématoxyline phloxine orange G (HPO) et trichrome de Masson.

## Résultats

### 1. Caractérisation du germe isolé

Les poissons malades ont présenté des nécroses congestives sur les flancs, une hémorragie au niveau des organes internes et dans la plupart des cas une xérophtalmie uni ou bilatérale (**Figures 1, 2**). Suite à ces lésions, les poissons effectuent des nages désordonnées ou sont isolés dans les coins et les angles morts, là où le courant d'eau est le plus faible.

*Vibrio alginolyticus* a été isolé en culture pure à partir des organes internes et des muscles ulcéreux des loups et des daurades malades. Il s'agit d'un bacille Gram négatif, oxidase, Voges-Proskauer, lysine décarboxylase positif et sensible au composé vibriostatique O/129.

### 2. Aspects histopathologiques liés à la vibriose

Les coupes histologiques sont réalisées au niveau des muscles des flancs caractérisés par des nécroses visibles macroscopiquement et au niveau des organes internes tels que le foie, le cœur et la rate.

#### 2-1. Au niveau du muscle

Le muscle des poissons atteints par *Vibrio alginolyticus* apparaît le plus endommagé, les nécroses observées sur les flancs se manifestent histologiquement par une

dégradation du tissu musculaire. Nous avons noté une nécrose des fibres musculaires, caractérisée par la désorganisation des faisceaux et par la disparition de la striation transversale. La réponse immunitaire se traduit par une infiltration de lymphocytes et de macrophages (Figures 3 A a, 3 A e).

## 2-2. Au niveau du cœur

Les coupes réalisées au niveau du ventricule montrent que le myocarde est constitué par des fibres musculaires striées. Les cellules myocardiques saines montrent la bifurcation caractéristique analogue à celles des mammifères. Chaque cellule renferme un noyau unique central ovale nucléolé et à chromatine poussiéreuse (Figure 3 B b). L'action de la bactérie au niveau du cœur se manifeste par une atteinte des fibres musculaires cardiaques provoquant ainsi une sarcolyse (Figure 3 B f).

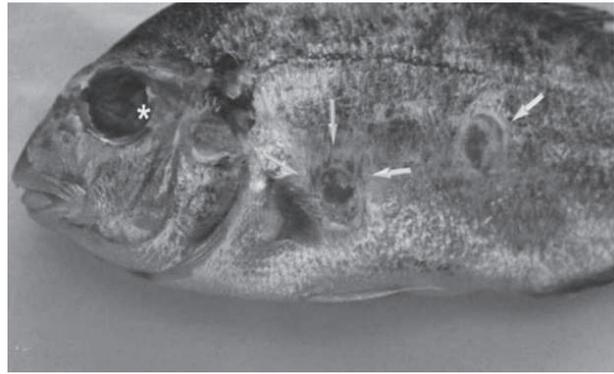
## 2-3. Au niveau du foie

Le foie est composé de cellules hépatiques de forme polyédrique organisées en lobules occupés par une veine centrolobulaire (Figure 3 C c). *V. alginolyticus* parvient à cet organe riche en cellules endothéliales et l'attaque bactérienne se manifeste par une nécrose hépatique caractérisée par la dégénérescence des cellules dont les noyaux diminuent de taille et deviennent pycnotiques (Figure 3 C g).

## 2-4. Au niveau de la rate

La rate, chez les poissons, constitue un organe hématopoïétique et un support anatomique de réponse immunitaire. Elle est riche en érythrocytes, en macrophages, en lymphocytes et en mélanomacrophages. Ces derniers constituent un aspect particulier aux poissons. Ils apparaissent dans une coupe de rate de daurade saine comme des colonies de cellules sombres distribuées le long du tissu hématopoïétique, entourées d'une paroi constituée de cellules aplaties renfermant une substance sombre c'est la mélanine (Figure 3 D d). Lors de la pathologie, la paroi est rompue et les élanomacrophages ainsi que les granules pigmentés sont dispersés le long du tissu splénique (Figure 3 D h).

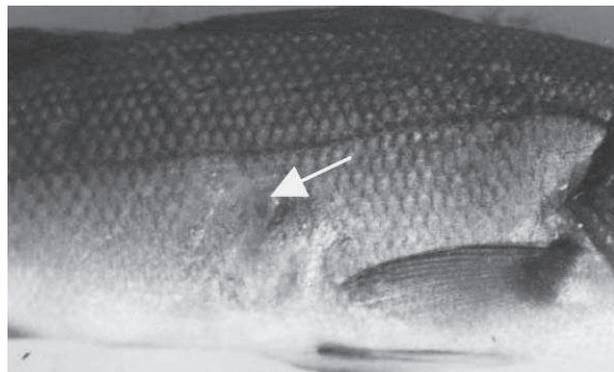
Les lésions au niveau de la rate sont bien modérées par rapport au foie et au cœur, par contre nous avons noté une hypertrophie des lymphocytes et des macrophages. Ces derniers contiennent des érythrocytes phagocytés, des granules et des débris cellulaires.



**Figure 1**

Daurade présentant une atteinte grave par *Vibrio alginolyticus*.  
*Gilt-head sea bream* presenting a serious case of *Vibrio alginolyticus* infection.

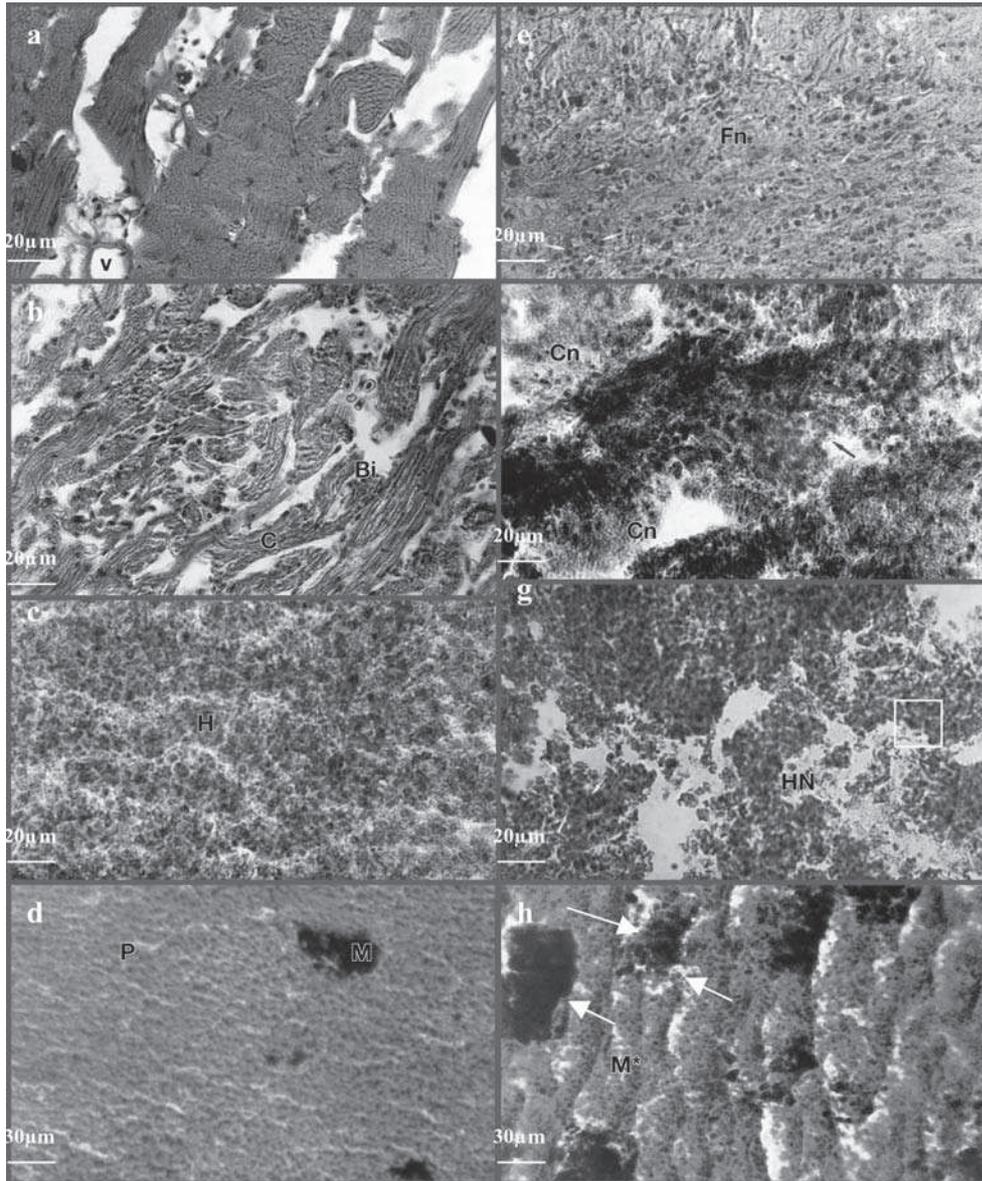
→ : ulcères profonds au niveau du flanc / deep ulcers in the side  
\* : xérophtalmie / xerophthalmia.



**Figure 2**

Nécrose congestive au niveau du flanc d'un loup atteint par *Vibrio alginolyticus*.

*Congestive necrosis of the side of a sea bass infected by *Vibrio alginolyticus*.*



**Figure 3**

A : Muscle strié squelettique d'une daurade : a) saine e) malade

*Striated skeletal muscle of a gilt-head sea bream: a) healthy e) diseased*

Coloration : Hématoxyline-phloxine-orange G / *Coloration: hematoxyline-phloxine-orange G*

F : faisceau musculaire / *muscle bundle*; V : vaisseau sanguin / *blood vessel*; Fm : Faisceau musculaire nécrosé / *muscle bundle with necrosis*; → : Infiltration lymphocytaire / *lymphocyte infiltration*

B : Myocarde d'une daurade b) saine f) malade / *Myocardium of a gilt-head sea bream b) healthy f) diseased*

Coloration : Trichrome de Masson / *Coloration: Masson Trichrome*

E : Erythrocytes / *Erythrocytes*; C : Cellule myocardique striée / *Striated myocardial cell*; Bi : Bifurcation / *Bifurcation*; Cn : Cellules myocardiques nécrosées / *Myocardial cells with necrosis*; → : Globules rouges agglomérés / *agglomerated red corpuscles*.

C : Foie d'une daurade c) saine g) malade / *Liver of a gilt-head sea bream c) healthy g) diseased*

Coloration : Hématoxyline-eosine / *Coloration: hematoxyline-eosine*

H : cellule hépatique nucléée / *nucleated hepatic cell*; → : Lymphocytes / *Lymphocytes*; HN : hépatocytes nécrosés / *hepatocytes with necrosis*; o : noyau pycnotique / *pyknotic nucleus*.

D : Rate d'une daurade d) saine h) malade / *Spleen of a gilt-head sea bream d) healthy h) diseased*.

Coloration : Hématoxyline-eosine / *Coloration: hematoxyline-eosine*

M : mélanomacrophages / *melanomacrophages*; Pr : pulpe rouge / *red pulp*; M\* : macrophages hypertrophiés / *macrophages with hypertrophia*; → : dispersion de macrophages et de mélanomacrophages / *dispersion of macrophages and melanomacrophages*.

## Discussion

Pendant ces dernières années, plusieurs épizooties causées par *V. alginolyticus* ont été déclarées chez la daurade *Sparus aurata* (Zorrilla *et al.*, 2003 a ; Ben Kahla-Nakbi *et al.*, 2006). Le Breton (1999), le considère comme le principal pathogène bactérien décrit dans l'élevage du loup et de la daurade dans la région méditerranéenne. Il paraît possible que les mesures prophylactiques comme la vaccination contre les pathogènes bactériens *V. anguillarum* et *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ont provoqué l'émergence d'espèces bactériennes opportunistes capables de causer des infections chez les poissons (Zorrilla *et al.*, 2003 b).

Dans ce travail, nous avons isolé *V. alginolyticus* en culture pure à partir des poissons malades au cours d'une épizootie du loup et de daurade. Les études histologiques ont montré que *V. alginolyticus* provoque une dégradation du tissu musculaire, cardiaque et hépatique, une nécrose, une liquéfaction et une digestion des cellules. Cette dégradation peut être due à l'action d'hydrolyse des produits extracellulaires (PEC) sécrétés par la bactérie, ainsi que l'effet de la réponse de l'hôte à cette action. Balebona *et al.* (1998 a) ont montré que l'injection des PEC à des poissons d'élevage (*Sparus aurata*) provoque une nécrose et une dégradation du tissu musculaire. De même Lamas *et al.* (1994) ont comparé les changements histopathologiques causés par *V. anguillarum* et ses PEC chez *Oncorhynchus mykiss*, et ils ont démontré que les PEC de *V. anguillarum* jouent un rôle important dans sa virulence.

Plusieurs facteurs favorisent l'expression de la virulence de *V. alginolyticus*. Les manipulations de pêche et de tri dans les bassins de prégrossissement sont stressantes pour les poissons, ce qui affaiblit leur système immunitaire et les sensibilise aux agents bactériens, en particulier aux vibrios en survie dans l'eau. Une lésion même infime constitue une voie plausible pour l'infection par *V. alginolyticus* et la densité des poissons élevés dans les bassins, ainsi que les conditions de température, salinité et oxygène dissous favorisent la multiplication et la transmission de ce germe.

Nos constatations sur la virulence de *V. alginolyticus* sont en accord avec les recherches faites dans les pays méditerranéens qui ont confirmé le pouvoir pathogène de cette bactérie dans les centres d'aquaculture. Il s'avère que le climat méditerranéen tempéré favorise la survie de ce germe dans les eaux des stations d'aquaculture tout en conservant sa virulence qui s'exprime en fonction de différents facteurs physiques, chimiques et biologiques. Il faut donc considérer que cette espèce est

pathogène opportuniste pour les poissons d'élevage et rechercher des stratégies de traitement et de prophylaxie adéquates pour les régions méditerranéennes.

## Remerciements

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire d'Histologie de la Faculté de médecine de Monastir pour leur aide considérable, ainsi que Monsieur Nakbi Hassen qui nous a fait le traitement des photos.

## Bibliographie

- Amaro C., E.G. Biosca, C. Esteve, B. Fouz, A.E. Toranzo**, 1992 - Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotype 1 and biotype 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities. *Dis. aquat. Org.*, **13** : 29-35.
- Anderson J.I.W., J. Conroy**, 1970 - *Vibrio* disease in marine fishes. In : *A symposium on diseases of fishes and shellfishes*. S.F. Snieszco (ed.). Am. Fish. Soc., Sp. publ. 5, Washington DC, pp : 266-272.
- Bakhrouf A., M. Jeddi, H. Ben Ouada**, 1992 - Essai d'identification de deux vibrios isolés dans une zone de pisciculture. *Microb. Hyg. alim.*, **4** : 3-6.
- Bakhrouf A., H. Ben Ouada, R. Oueslati**, 1995 - Essai de traitement des vibrioses du loup *Dicentrarchus labrax* dans une zone de pisciculture, à Monastir, Tunisie. *Mar. Life*, **5** : 47-54.
- Balebona M.C, M.J. Andreu, A.M. Bordas, I. Zorrilla, A.M. Morinigo, J.J. Borrego**, 1998 a - Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl. environ. Microbiol.*, **64** : 4269-4275.
- Balebona M.C., I. Zorrilla, M.A. Mori igo, J. J. Borrego**, 1998 b - Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, **166** : 19-35.
- Ben Kahla-Nakbi A., K. Chaieb, A. Besbes, T. Zmantar, A. Bakhrouf**, 2006 - Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilt-head sea bream and sea bass outbreaks. *Vet. Microbiol.*, **117** : 321-327.
- Egidius E.**, 1987 - Vibriosis pathogenicity and pathology : A review. *Aquaculture*, **67** : 15-28.
- Frerichs G.N., R.J. Roberts**, 1989 - The bacteriology of teleosts. In : *Fish pathology*, 2<sup>nd</sup> ed. R.J. Roberts (ed.). Baillière, Tindall, London, England, pp : 289-319.

**Krieg N.R., J.G. Holt**, 1984 - *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 964 pp.

**Lamas J., Y. Santos, D. Bruno, A.E. Toranzo, R. Anadon**, 1994 - A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathol.*, **29** : 79-89.

**Le Breton A.D.**, 1999 - Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bull. eur. Assoc. Fish Pathol.*, **19** : 250-253.

**Vera P., J.I. Navas, B. Fouz**, 1991 - First isolation of *Vibrio damsela* from sea bream (*Sparus aurata*). *Bull. eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11** : 112-113.

**Zorrilla I., M. Chabrilón, S. Arijó, P. Díaz Rosales, E. Martínez-Manzanares, M.C. Balebona, M.A. Moriñigo**, 2003 a - Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture*, **218** : 11-20.

**Zorrilla I., M.A. Moriñigo, D. Castro, M.C. Balebona, J.J. Borrego**, 2003 b - Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain. *J. appl. Microbiol.*, **95** : 106-116.

*Reçu en décembre 2004 ; accepté en février 2007.  
Received April 2004 ; accepted February 2007.*