



HAL
open science

Bactéries pathogènes, hôtes, et environnement : une approche multifactorielle pour l'étude de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie

Cyrille Goarant

► **To cite this version:**

Cyrille Goarant. Bactéries pathogènes, hôtes, et environnement : une approche multifactorielle pour l'étude de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2010. tel-00495066

HAL Id: tel-00495066

<https://theses.hal.science/tel-00495066>

Submitted on 28 Jun 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Mémoire présenté à l'Université Montpellier 2
Pour l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches**

**Bactéries pathogènes, hôtes, et environnement :
une approche multifactorielle pour l'étude de la
leptospirose en Nouvelle-Calédonie.**

par

Cyrille GOARANT

**Laboratoire de Recherche en Bactériologie
Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie**

le 15 Juin 2010

Jury

Bernard Godelle :	Président
Eric Coissac :	Rapporteur
Paul Martin :	Rapporteur
Geneviève Milon :	Rapporteur
Geneviève André-Fontaine :	Examineur
Evelyne Bachère :	Examineur
Roger Frutos :	Examineur

*On ne croit savoir que quand on sait peu ;
avec la science augmente le doute.*

Goethe (Maximes et réflexions)

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à M. Roger FRUTOS pour m'avoir accompagné dans ce travail et à Mme Suzanne CHANTEAU pour m'avoir incité à le mettre en œuvre. Ils ont su notamment me convaincre de l'intérêt d'intégrer ce cadre un peu contraignant et m'aider à mettre en forme ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme Geneviève MILON, M. Paul MARTIN et M. Eric COISSAC qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail. Ma reconnaissance va aussi à M. Bernard GODELLE, qui a gentiment accepté de diriger le jury de cette HDR, ainsi qu'à Mme Geneviève ANDRÉ-FONTAINE, Mme Evelyne BACHÈRE et M. Roger FRUTOS qui ont bien voulu prendre part à ce jury.

Mon travail passé a été réalisé en grande partie dans le cadre de mon activité au sein de l'IFREMER en Nouvelle-Calédonie. Que mes collègues de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent et de la délégation IFREMER de Nouvelle-Calédonie trouvent ici mes remerciements pour leur aide, proche ou moins proche, au cours de ces années de travail. Les personnes notamment qui ont travaillé dans mon équipe au cours de ces années ont vécu en ma compagnie les espoirs, déceptions et plaisirs de cette recherche. Les aquaculteurs de Nouvelle-Calédonie trouvent ici aussi ma gratitude, ceux notamment qui ont pris sur leur temps pour m'exposer leur perception des phénomènes pathologiques qui nous intéressaient ou débattre de nos points de vue et les confronter, ceux aussi qui m'ont ouvert leurs bassins, leurs cahiers... Ces discussions ne sont jamais vaines. Ce n'est qu'avec votre aide que la recherche avancera et qu'avec l'aide de la recherche que vous trouverez les solutions de progrès nécessaires : quel bel exemple appliqué de l'interdépendance et de la pluridisciplinarité !

Plusieurs volets de ce travail au sein de l'IFREMER l'ont été dans le cadre de collaborations avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Les directeurs ainsi que les chefs successifs du laboratoire des Leptospires nous ont toujours ouvert leur porte et je les en remercie à nouveau.

C'est d'ailleurs, maintenant, au sein de cet Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie que je poursuis mon activité. Je remercie Fabrice Mérien avec qui j'ai bien souvent travaillé, qui est depuis devenu un ami et... dont j'occupe maintenant la place qu'il a quittée ! J'espère qu'il retrouvera, dans le programme que nous mettons en œuvre, la voie qu'il avait tracée. Je remercie également Paul Martin, alors directeur de l'IPNC, qui a accepté de soutenir ma candidature à ce poste, ainsi que

l'ensemble du personnel du laboratoire des Leptospires avec qui je travaille avec plaisir chaque jour. Tous m'ont toujours accueilli dans la bonne humeur et ont su m'apporter une grande aide.

J'adresse plus encore tous mes remerciements à mes collègues du Laboratoire de Recherche en bactériologie :

Frédérique, qui a brillamment « gardé la maison » entre le départ de Fabrice et mon arrivée puis a toujours fait preuve d'une grande force de travail et d'une belle rigueur. Je suis persuadé que nous avons fait « du bon boulot » ensemble ! Les parisiens m'ont enlevé, avec toi, un véritable pilier du labo !

Julie, avec qui nous essayons de décortiquer l'écologie de la leptospirose. Même la chasse aux rats, même la dissection des reins de cochons à 7h du matin à l'abattoir, même la guerre aux contaminations ont toujours été un plaisir avec toi. « On avance ! »

Marlène que je contribue à guider dans ses travaux sur mes anciens microbes préférés, les *Vibrio*, dont l'enthousiasme m'a si souvent été un précieux « remonte-moral ». Merci de ton sourire, de ton enthousiasme et de ton dynamisme !

Carine, notre « petite nouvelle » qui a si vite trouvé sa place... (prédestinée ?!) et avec qui nous devons écrire l'avenir de ce labo. Je te regretterai...

Mariko, j'essaierai de t'accompagner pour réussir ta conversion à l'étude des maladies infectieuses et à la microbiologie, mais connaissant ton énergie et ta motivation, je suis sûr que nous avancerons bien !

Que tous ceux qui m'ont appris à travailler, donné ma chance, ou aidé au cours de ces années ne se sentent pas oubliés. A mon âge, les lister comporterait un trop grand risque d'être taxé de sénilité... mais je n'oublie pas ceux qui m'ont tracé la voie et ouvert des portes. Je sais qu'on n'arrive à rien tout seul.

J'ai aussi une pensée pour ceux à qui, à mon tour, j'ai essayé d'ouvrir des portes. L'avenir vous appartient.

Merci mon amie Fredo des *Vibrio*, ces bactéries sont super-passionnantes, j'espère continuer à échanger de la science et de l'amitié avec toi. Merci Mathieu, mon maître es-Lepto, de ton super accueil dans mon nouveau monde.

À Anne-Claire, Colas et Maël

Ils savent à quel point ils comptent pour moi.

À mes parents, ma famille

Sommaire

Introduction	5
I. Curriculum vitae	8
I.A. Formation et diplômes	8
I.B. Cursus professionnel	8
I.C. Formations suivies durant la vie professionnelle	9
I.D. Production scientifique et indicateurs de notoriété	10
I.D.1. Reviewer d'articles, comités de lectures et expertise de projets	10
I.D.2. Thèses	10
I.D.3. Articles dans des revues à comité de lecture	10
I.D.4. Ouvrage	12
I.D.5. Chapitres d'ouvrages, articles dans Actes de colloque	12
I.D.6. Articles à destination des professionnels	14
I.D.7. Colloques, congrès, conférences et posters	14
I.D.8. Rapports de projets et rapports référencés	17
I.D.9. Présentations à workshops / groupes de travail :	18
I.D.10. Recherches de financement	19
I.E. Collaborations	19
I.F. Encadrement et enseignement	22
I.F.1. Encadrement d'équipes de recherche	22
I.F.2. Encadrement de Masters (DEA, DESS)	25
I.F.3. Accueil de post-doctorants	27
I.F.4. Co-encadrement de doctorants	28
I.F.5. Encadrement d'étudiants d'autres niveaux	30
I.F.6. Rédaction de supports pédagogiques, formations, enseignement	32
I.F.7. Jury de thèse	32
II. Résumé des travaux antérieurs	33
II.A. Résumé des travaux au cours de la thèse	33
<i>Article 1 : Les crevettes ne sont pas affectées avant un certain stade de développement.</i>	33
<i>Article 2 : Épidémiologie moléculaire des Vibrio associés au Syndrome 93 affectant les crevettes en élevage</i>	34
<i>Article 3 : Une voie d'entrée possible du Vibrio dans la crevette : la pénétration transcuticulaire</i>	35
<i>Article 4 : Exotoxines des Vibrio responsables du Syndrome 93 chez les crevettes en élevage</i>	36
II.B. Principales contributions au Défi Santé <i>stylirostris</i>	37
<i>Article 5 : Description générale du Syndrome d'été et identification de l'agent étiologique</i>	37
<i>Article 6 : Épidémiologie moléculaire et pathologie expérimentale du syndrome d'été : une souche hautement pathogène mise en évidence</i>	38
<i>Articles 7 et 8 : Des outils diagnostiques puissants et adaptés</i>	39
<i>Article 9 : Un plasmide corrélé à la virulence chez les souches de V. nigripulchritudo du Syndrome d'été</i>	41
<i>Article 10 : Application des outils moléculaires au suivi des Vibrio pathogènes dans le milieu</i>	42
<i>Articles 11 et 12 : Des exemples de facteurs de stress illustrant l'intérêt de l'approche multifactorielle</i>	43
<i>Articles 13 et 14 : La sélection génétique comme une des approches les plus prometteuses pour contrer les vibrioses des crevettes en élevage</i>	45
II.C. Travaux sur le génotypage de déterminants de résistance aux antibiotiques chez des bactéries d'intérêt en santé publique	47

Article 15 : Développement d'outils de surveillance moléculaire de la sensibilité des gonocoques aux pénicillines et découverte d'un nouveau génotype de la porine responsable d'une baisse de sensibilité	47
Article 16 : Développement d'outils de surveillance moléculaire de la résistance des gonocoques aux fluoroquinolones.....	48
Article 17 : Développement d'outils de surveillance moléculaire de la sensibilité des pneumocoques aux fluoroquinolones	49
Article 18 : Validation multicentrique des outils de surveillance moléculaire de la sensibilité des gonocoques aux antibiotiques.....	50
III. Projet de Recherche : La leptospirose en Nouvelle-Calédonie	51
III.A. La leptospirose, une maladie grave et méconnue.....	51
III.B. La leptospirose à l'ère de la génomique	55
Article 19 : Revue sur les progrès récents permis par les apports de la génétique et de la génomique à la connaissance des leptospires et de la leptospirose.	57
III.C. La leptospirose en Nouvelle-Calédonie.....	58
Article 20 : L'épidémie de leptospirose du premier semestre 2008 en Nouvelle-Calédonie : questions diagnostiques et charge de morbidité	59
III.D. Projet de recherche	60
III.D.1. Objectifs	60
III.D.2. Développement d'un test de diagnostic rapide de la leptospirose.....	61
Projet de recherche : « Développement et validation d'un test de diagnostic rapide de la leptospirose »	61
III.D.3. La réponse immune de l'hôte comme composante intrinsèque de la maladie : indicateurs pronostiques déduits	62
Article 21 : Recherche d'indicateurs pronostiques des formes graves de leptospirose : études sur un modèle animal.	64
Projet de recherche : « Recherche d'indicateurs pronostiques de gravité lors d'une infection à <i>Leptospira</i> : suivis sur des patients hospitalisés »	67
III.D.4. Les schémas de circulation et de transmission des <i>Leptospires</i> pathogènes en Nouvelle-Calédonie.....	68
Projet de recherche : « L'histoire naturelle de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie »	69
III.D.5. En guise de conclusion : Vers une meilleure (re)connaissance de la leptospirose : mise en place d'un réseau de diagnostic	70
Article 22 : Mise en évidence d'une forte incidence de la leptospirose au Cambodge.	72
Projet en cours : « Mise en place d'un réseau de diagnostic de la leptospirose au sein du Réseau International des Instituts Pasteur et évaluation de son poids en santé publique »	73
III.E. Références bibliographiques	74
IV. Autres ouvrages ou publications dans des revues à comité de lecture.....	80

Introduction

Parmi les formes de vie présentes sur Terre, les « microbes » (champignons unicellulaires, bactéries et virus) sont de loin les plus abondants. Les océans contiendraient par exemple environ 10^{30} virus, l'ensemble des sols de la planète 4 à $5 \cdot 10^{30}$ microbes (hors virus), un seul gramme de terre environ $2,5 \cdot 10^{10}$ bactéries. Ces « microbes » représenteraient ainsi 60% de la biomasse présente sur Terre (Singh *et al.* 2009). Quelques uns de ces microbes ont depuis longtemps été « domestiqués » de façon empirique et nous leur devons - par exemple - le vin, le pain, ou le fromage.

Bien que ces chiffres soient très spéculatifs, on estime qu'il existerait entre 10^7 et 10^9 espèces bactériennes et près de 10^6 espèces de levures (Hawksworth 2001) colonisant à peu près tous les écosystèmes de la Terre, témoignant ainsi de leur extrême diversité biologique.

Ensemble complexe d'environ 10^{13} cellules eucaryotes, le corps humain héberge quant à lui environ 10^{15} bactéries, dont environ 10^{14} habitent le tube digestif. Ces 10^{13} cellules humaines « cohabitent » donc, le plus souvent en bonne intelligence, avec environ 100 fois plus de bactéries. Au niveau de la diversité, on estime entre 500 et 1000 le nombre d'espèces bactériennes qui colonisent le corps humain. De même, le matériel génétique bactérien hébergé par l'humain pourrait représenter 100 fois le matériel génétique humain lui-même (Savage 1977; Xu & Gordon 2003; Backhed *et al.* 2004; Backhed *et al.* 2005; Rajilic-Stojanovic *et al.* 2007).

Le microbiote associé aux animaux est de plus en plus souvent considéré à l'égal d'un « organe » et étudié pour son rôle dans la digestion (hydrolyse de composés réfractaires aux enzymes d'origine animale), dans l'apport nutritif quantitatif mais surtout qualitatif par la synthèse de composés indispensables, mais aussi dans l'immunité de la peau et des muqueuses (Krutmann 2009; Mason & Huffnagle 2009; Slack *et al.* 2009). Chez les invertébrés, dont le milieu intérieur peut lui-même contenir des bactéries, la participation significative de celles-ci à l'immunité est maintenant une hypothèse très largement partagée et étudiée (Haine 2008).

Ainsi, les quelques centaines d'espèces de bactéries pathogènes ne constituent qu'une très faible minorité de l'immense monde bactérien. Toutefois, du fait des maladies parfois graves dont elles sont responsables, c'est vers ces bactéries pathogènes que les microbiologistes ont porté leur plus grand intérêt. Les épidémies historiques de peste ou de choléra - par exemple - ont progressivement reculé dans les pays riches, principalement grâce aux progrès du

diagnostic et de l'hygiène mais aussi à la découverte des antibiotiques. Elles resurgissent toutefois régulièrement, notamment dans les pays en développement. Avec l'accroissement des phénomènes de résistances aux antibiotiques, de nouveaux types d'épidémies, impliquant l'expansion de clones de bactéries multi-résistantes, commencent à voir le jour et font craindre que les antibiotiques ne puissent pas constituer une solution éternelle.

Parmi les bactéries pathogènes, quelques espèces sont strictement inféodées à l'homme et aucun autre mode de vie ne leur est connu (par exemple *Neisseria gonorrhoeae* l'agent étiologique de la blennorragie). Néanmoins, la plupart de ces bactéries pathogènes ne sont pas des pathogènes obligatoires de l'homme. Certaines d'entre elles parviennent à l'homme à l'issue d'un cycle complexe impliquant d'autres hôtes, vertébrés et/ou invertébrés (par exemple *Yersinia pestis* l'agent étiologique de la peste). D'autres enfin peuvent avoir une vie en dehors de toute espèce hôte et sont véhiculées par - ou vivent dans - l'environnement (par exemple *Vibrio cholerae* l'agent étiologique du choléra).

Enfin, une même bactérie pathogène pourra, chez certains individus d'une population d'hôtes, provoquer une maladie sévère voire mortelle mais une infection bénigne voire inapparente chez d'autres. Le nombre (dose infectante), la virulence propre ou la voie par laquelle ce pathogène est parvenu à infecter son hôte font souvent partie des éléments expliquant ce polymorphisme clinique. Toutefois, l'état physiologique ou immunitaire de cet hôte, comme certains facteurs génétiques, contribuent également à expliquer cette différence de sensibilité.

Ainsi, lors de l'étude d'une maladie humaine, animale - ou même végétale - d'origine bactérienne, à côté des éléments liés à la vie de la bactérie dans son hôte (pathogénie) et aux facteurs qui lui sont propres et conduisent à la maladie (virulence ou pathogénicité), on voit la nécessité d'intégrer dans les connaissances à acquérir des éléments liés à la vie de la bactérie pathogène hors de son hôte d'intérêt, tout comme des facteurs expliquant ou prédisant la sensibilité individuelle de l'hôte (Waldvogel 2004).

Le premier modèle sur lequel j'ai travaillé, au sein de l'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (IFREMER) était celui de vibrioses affectant les élevages de crevettes *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie. Ces élevages se déroulent dans des bassins à fond de terre construits à l'arrière des mangroves et qui sont remplis d'eau de mer pompée à proximité. Les *Vibrio* sont des bactéries ubiquistes des écosystèmes marins et estuariens et ont

des modes de vie qui peuvent être très variés : pélagiques / planctoniques, benthiques, formant des biofilms à la surface de supports inertes ou épibiotiques à la surface d'animaux ou de végétaux marins. Certaines espèces de *Vibrio* sont connues pour être symbiotiques chez des animaux marins et c'est également dans ce genre bactérien que des phénomènes tels que la luminescence ou le quorum sensing ont été mis en évidence et le plus étudiés. Certaines espèces de ce genre ont des représentants qui présentent un pouvoir pathogène pour l'homme ou les animaux marins. Les *Vibrio* développent également des formes de résistance décrits sous le nom d'états « viables non cultivables ».

Nous avons, pour étudier ces vibrioses, développé un programme pluridisciplinaire étudiant non seulement les *Vibrio* pathogènes, mais également les facteurs liés à la crevette (physiologie et génétique) et à l'écosystème d'élevage. Les travaux auxquels j'ai contribué sont présentés sous forme d'articles.

Mon projet de recherche actuel concerne la leptospirose, une zoonose (maladie commune aux humains et aux animaux) qui est contractée par l'homme auprès d'un réservoir animal ou de l'environnement. L'épidémiologie de cette maladie bactérienne comporte donc également une forte composante environnementale. Cette maladie se caractérise par un polymorphisme clinique remarquable, allant de formes pseudo-grippales à guérison spontanée à des formes graves, qui peuvent être fatales. La sensibilité de l'hôte apparait donc également comme un élément majeur pour la compréhension de cette maladie. Mon projet de recherche propose donc également une approche multifactorielle, abordant des questions concernant le pathogène, la sensibilité de l'hôte et l'écologie de la bactérie dans l'environnement. Les différents volets ainsi que les travaux en cours dans ce cadre en sont exposés.

I. Curriculum vitae

Cyrille GOARANT

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
Laboratoire de Recherche en Bactériologie
BP 61 Nouméa, 98845 Nouméa cedex
Nouvelle-Calédonie
Tel : (687) 27 97 46
Fax : (687) 27 33 90
Mel : cgoarant@pasteur.nc

Né le 3 février 1968 à Saint Martin d'Hères (Isère)
Marié, deux enfants

I.A. Formation et diplômes

1998-2000 : Thèse de Sciences Université de Polynésie Française

(Mention très honorable avec les félicitations du jury) :

"Épidémiologie et facteurs de virulence des bactéries du genre *Vibrio* responsables de mortalités de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Perspectives de lutte".

1997 : Thèse de doctorat vétérinaire

(Mention très honorable avec les félicitations du jury) :

"Contribution à l'étude de la dynamique des populations de Mérous bruns (*Epinephelus marginatus*) dans le bassin occidental de la Méditerranée par l'étude du polymorphisme enzymatique"

1992 : Diplômé de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

1988-92 : École Nationale Vétérinaire de Lyon.

1986-88 : Classes préparatoires aux écoles vétérinaires à Grenoble.

I.B. Cursus professionnel

Depuis avril 2007 : Responsable du Laboratoire de Recherche en Bactériologie à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Référent Biologie Moléculaire au sein de cet Institut.

Mai 1995 à mars 2007 : Cadre de Recherche en pathologie des crevettes Pénéides au Laboratoire Aquacole de Calédonie (IFREMER) en Nouvelle-Calédonie. Programmation et mise en œuvre des actions de recherche sur les mortalités saisonnières des crevettes Pénéides. Bactériologie, pathologie expérimentale, épidémiologie, diagnostic. Collaborations internes au sein de l'IFREMER et avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, l'IRD, l'Université de

Townsville (Australie)... Membre du comité scientifique et organisateur du colloque « Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie ». Responsabilité éditoriale des actes du colloque dans la collection « Actes de colloques » de l'Ifremer.

Année 2006 : Chercheur Ifremer détaché à 80% à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

2005 : Passage en catégorie **Cadre de Recherche II** de l'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (**IFREMER**) après examen d'un dossier personnel par un jury externe.

1993-95 : Volontaire à l'aide technique au Centre Océanologique du Pacifique (IFREMER) à Tahiti en Pathologie des Pénéides :

Microbiologie marine, histologie, modélisations expérimentales d'infections, élevages larvaires.

1990-93 : Gardes, remplacements et exercice en cliniques vétérinaires canines, rurales et mixtes.

I.C. Formations suivies durant la vie professionnelle

2009 : Formation « Manager son équipe au quotidien » (1 semaine).

2008 : Formation à la bio-informatique (4 jours de cours et TP).

2001 : Cours de Microbiologie Générale de l'Institut Pasteur de Paris

(300 heures de conférences et de travaux pratiques sur l'étude de la virulence chez les *Bacillus* pathogènes). Mention TB (moyenne 17,33 / 20) et classé 2nd sur 24.

1998 : "Shrimp pathology short course" à l'University of Arizona : Monographie des pathologies des crevettes d'élevage, anatomie pathologique, hybridation *in situ*...

I.D. Production scientifique et indicateurs de notoriété

I.D.1. Reviewer d'articles, comités de lectures et expertise de projets

- ◆ Expert externe pour un projet répondant à l'appel d'offre Europôle Mer axe 1 « Génomique Marine et Chimie bleue » de Mars 2008
- ◆ Comité de lecture et comité éditorial de l'ouvrage collectif : Herbland, A. Harache, Y. (coord.) Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quæ, 2008, 143 pages.
- ◆ Reviewer pour des articles dans
 - Aquaculture (22 manuscrits entre 2007 et 2009)
 - Fish and Shellfish Immunology (1 manuscrit en 2007)
 - Diseases of Aquatic Organisms (2 manuscrits en 2007)
 - FEMS Microbiology Ecology (2 manuscrits en 2008 et 2009)
 - Journal of Microbiological Methods (2 manuscrits en 2008)
 - Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (1 manuscrit en 2009)
 - Journal of Emergencies, Trauma, and Shock (1 manuscrit en 2009)
 - BMC Genomics (1 manuscrit en 2009)
 - BMC Microbiology (1 manuscrit en 2010).

I.D.2. Thèses

Thèse vétérinaire :

Goarant C. (1998) Contribution à l'étude des populations de mérous bruns (*Epinephelus marginatus*) dans le bassin méditerranéen occidental par l'étude du polymorphisme enzymatique. Thèse pour le diplôme de docteur vétérinaire. 56 pages.

Thèse de doctorat de sciences :

Goarant C. (2000) : Épidémiologie et facteurs de virulence des bactéries du genre *Vibrio* responsables de mortalité de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Perspectives de lutte. Thèse pour le diplôme de docteur vétérinaire. Thèse de doctorat de Sciences. 174 pages.

I.D.3. Articles dans des revues à comité de lecture

Dans les listes ci-après apparaissent **en gras** les thésards et post-docs encadrés ou co-encadrés, **en gras et italique** les étudiants encadrés (stages, DEA, Masters) ou autres personnels en cours de formation scientifique (VCAT).

1. Berlioz-Arthaud A., Guillard B., Goarant C. & Sopheak H., (accepté) Surveillance active de la leptospirose humaine en milieu hospitalier au Cambodge. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.
2. Vernel-Pauillac F. & Goarant C. (2010) Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. PLoS Neglected Tropical Diseases.**4**: e582.
3. Walling E., Vourey E., Ansquer D., Beliaeff B. & Goarant C. (2010) *Vibrio nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediments. Journal of Applied Microbiology. Sous presse.
4. Vernel-Pauillac F., Ratsima EH., Guillard B., Goursaud R., Lethezer C., Hem S., Merien F., & Goarant C. (2010) Correlation between antibiotic susceptibilities and genotypes in *Neisseria gonorrhoeae* from different geographical origins: determinants monitoring by real-time PCR as a complementary tool for surveillance. Sexually Transmitted Infections. Sous presse.
5. Ko A., Goarant C. & Picardeau M. (2009) Leptospira at the dawn of the genomic era. Nature Reviews Microbiology. **7**:736-47.
6. Goarant C., Laumond-Barny S., **Perez J.**, Vernel-Pauillac F., Chanteau S. & Guigon A. (2009) Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: Diagnosis issues and Burden of Disease. Tropical Medicine and International Health. **14**: 926-929.
7. Vernel-Pauillac F., Hogan T., Tapsall J. & Goarant C. (2009). Quinolone-resistance in *Neisseria gonorrhoeae* : Rapid genotyping of QRDRs in *gyrA* and *parC* genes by melting curve analysis predicts susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **53(3)**: 1264-1267.
8. **Page S.**, Vernel-Pauillac F., **O'Connor O.**, Bremont S., Charavay F., Courvalin P., Goarant C., & Le Hello S. (2008) RT-PCR detection of *gyrA* and *parC* mutations from *Streptococcus pneumoniae* DNA extract. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **52(11)**: 4155-4158.
9. Vernel-Pauillac F., Nandi S., Nicholas, RA. & Goarant C. (2008) Genotyping as a tool for antibiotic resistance surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* in New Caledonia: evidence of a novel genotype associated with reduced penicillin susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **52(9)**: 3293-300.
10. Goyard E., Goarant C., Ansquer D., Broutoi F., Brun P., **de Decker S.**, Dufour R., Galinié C., Mailliez JR., Peignon JM., Pham D., Vourey E., Patrois J. & Harache Y. (2008) A case study of R&D for small isolated aquaculture industries: genetic management of the domesticated *Litopenaeus stylirostris* shrimp population of New Caledonia. Aquaculture Europe **33(2)**: 5-11.
11. **de Lorgeril J.**, Gueguen Y., Goarant C., Goyard E., Mugnier C., Fievet J., Piquemal D. & Bachere E. (2008). A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. Molecular Immunology. **45**: 3438-3445
12. Goyard E., Goarant C., Ansquer D., Brun P., **de Decker S.**, Dufour R., Galinié C., Peignon JM., Vourey E., Harache Y. & Patrois J. (2008) Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture **278**:43-50.
13. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Mazel D., Goarant C. & Le Roux F. (2008) Correlation between the detection of a plasmid and high virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Applied and Environmental Microbiology. **74**: 3038-3047.
14. Mugnier C., **Zipper E.**, Goarant C. & Lemonnier H. (2008) Combined effect of external ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, **274**, 398-407.
15. Goarant C., **Reynaud Y.**, Ansquer D., **de Decker S.** & Mérien F. (2007). Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging clone pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. Journal of Microbiological Methods **70**, 30-38.

16. Saulnier D., **Reynaud Y.**, Arzul I., Miossec L., Le Roux F. & Goarant C. (2007) Émergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples. INRA Prod. Anim. **20**, 207-212.
17. Goarant C., **Reynaud Y.**, Ansquer D., **de Decker S.**, Saulnier D. & Le Roux F. (2006) Virulence and molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Systematic and Applied Microbiology **29**, 570-580.
18. Goarant C., & Merien F. (2006). Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp farming, by real time PCR using SYBR Green I chemistry. Journal of Microbiological Methods **67**, 27-25.
19. Goarant C., Ansquer D., Herlin J., **Domalain D.**, **Imbert F.** & **de Decker S.** (2006) : "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture, **253**, 105-113.
20. Lemonnier H., Bernard E., Boglio E., Goarant C. & Cochard J-C (2004) Influence of sediment characteristics on shrimp physiology: pH as principal effect. Aquaculture, **240**, 297-312.
21. Goarant C., **Brizard R.** & Marteau AL. (2000) A white spot disease-like syndrome in the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) as a form of bacterial shell disease. Aquaculture **183**, 25-30.
22. Goarant C. & Boglio E. (2000) Changes in hemocyte counts in the shrimp *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination. Journal of the World Aquaculture Society **31**, 123-129.
23. Goarant C., **Herlin J.**, **Brizard R.**, Marteau AL., Martin C. & Martin B (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Diseases of Aquatic Organisms **40**, 101-107
24. Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P. & Ansquer D (2000) Experimental infection models for shrimp vibriosis studies : a review. Aquaculture **191**, 133-144
25. Goarant C., Mérien F., Berthe F., Mermoud I. & Pérolat P (1999) Arbitrarily Primed PCR to type *Vibrio* spp pathogenic for shrimp. Applied and Environmental Microbiology **65**, 1145-1151.
26. Goarant C., **Régnier F.**, **Brizard R.** & Marteau AL (1998) Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. Aquaculture **169**, 291-296.
27. Mermoud I., Costa R., Ferré O., Goarant C. & Haffner P (1998) Syndrome 93 in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of the three major outbreaks. Aquaculture **164**, 323-335

I.D.4. Ouvrage

- Goarant C., Harache Y., Herbland A. & Mugnier C. (2004). Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Ifremer. Actes de Colloques n° 38. 280 pages.

I.D.5. Chapitres d'ouvrages, articles dans Actes de colloque

1. Vernel-Pauillac F., Goursaud R., Merien F., Nicholas R., Tapsall J. & Goarant C. (2009) Phenotypic and molecular study of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* collected by a New Caledonian sentinel network. In Proceedings of the Pacific Science Intercongress. ISBN N°978-2-11-098964-2

2. Goarant C., Vernel-Pauillac F., Guigon A., **Perez J.**, Brescia F., Picardeau M., Nato F. & Chanteau S (2009) Leptospirosis as a major public health concern in New Caledonia: the need for a multidisciplinary approach. In Proceedings of the Pacific Science Intercongress. ISBN N°978-2-11-098964-2
3. Majorel-Loulergue C., Maggia L., Wabete N., Goarant C., Lebrun M., Amir H. & Angue JC. (2009) The regional genomic core research facilities for life science in New-Caledonia « Plate-Forme du Vivant de Nouvelle-Calédonie : PFV-NC” In Proceedings of the Pacific Science Intercongress. ISBN N°978-2-11-098964-2
4. Beliaeff B., Chim L., Della Patrona L., Goyard E., Herlin J., Labreuche Y., Walling E., Ansquer D., Brun P., Castex M., Coatanea D., Courties C., De Lorgeril J., Dufour R., Frappier J., Goarant C., Huber M., Lemaire P., Lemonnier H., Le Roux F., Loubersac L., Lucas R., Patrois J., Peignon J.-M., Pham D., Ramage Y., Soulard B., **Vic M.**, Vourey E., Wabete N. (2009) DEDUCTION: A Research Project for Shrimp Farming Sustainability in New Caledonia. ISBN N°978-2-11-098964-2
5. Chim L., Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., Wabete N., Ansquer D., Brun P. & Lemaire P. (2008) Le Syndrome 93. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE. ISBN-13 978-2-7592-0080-1
6. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., **de Decker S.**, Courties C., Della Patrona L., Herbland A., Herlin J., **Reynaud Y.** & Ansquer D. (2008) Le Syndrome d'été. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE. ISBN-13 978-2-7592-0080-1
7. Goyard E., Chim L., Della Patrona L., Castex M., **de Decker S.**, Goarant C., Herbland A., Patrois J., Pham D., Wabete N. & Brun P. (2008) Sortir de la crise : recherche de solutions. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE. ISBN-13 978-2-7592-0080-1
8. Herbland A., Goarant C., Goyard E., Chim L. & Della Patrona L. (2008) Synthèse. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE. ISBN-13 978-2-7592-0080-1
9. **Lefèvre J.**, Lemonnier H., Goarant C. & Blanchot J. (2004) Évolution des paramètres physico-chimiques et biologiques de bassins d'élevage de crevette soumis à deux régimes de renouvellements en eau avant et pendant des mortalités de type « Syndrome 93 ». In : Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, p 158-166. ISBN-10 2-84433-134-3
10. Goarant C., Herlin J., Ansquer D., **Brizard R.** & Marteau AL. (2004). *Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 203-209. ISBN-10 2-84433-134-3
11. Goarant C., Herlin J., Ansquer D., **Imbert F.**, **Domalain D.** & Marteau AL. (2004). Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été : résultats préliminaires du programme DESANS. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 210-215. ISBN-10 2-84433-134-3
12. Saulnier D., Goarant C., Charlier J., Ansquer D., Levy P., Labreuche Y., **de Lorgeril J.**, Bachère E., Aguirre-Guzman G. & Cochennec-Laureau N. (2004). Apports d'un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves pour l'étude d'une vibriose. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 216-222. ISBN-10 2-84433-134-3
13. Primot P., **Herlin J.**, Ferré O., Sadonès H., **Domalain D.** & Goarant C. (2004). Stratégies d'épidémiosurveillance et d'épidémiovigilance pour la filière crevettes de Nouvelle-Calédonie : présentation des résultats de la campagne 2002. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 229-235. ISBN-10 2-84433-134-3

14. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C. & Herbland A. (2004). Synthèse provisoire sur l'approche pluridisciplinaire du syndrome d'été. (Programme DeSanS). In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 255-260. ISBN-10 2-84433-134-3
15. Le Moullac G., *Phillip de Laborie L.*, Saulnier D., Goarant C. & Dehasque M. (1998) Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. Memorias IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola 15 al 18 de Noviembre de 1998, La Paz, BCS, México, pp. 1-10.

I.D.6. Articles à destination des professionnels

1. Guigon A. & Goarant C. (2008). Pendant l'épidémie de dengue, n'oublions pas la leptospirose ! Bulletin Médical Calédonien et Polynésien, Numéro 51, page 29. Mai 2008.
2. Vernel-Pauillac F., Goursaud R., Lethezer C.; Mérien F. & Goarant C. (2007) Gonococcies: Peut-on encore préconiser la pénicilline ? Bulletin Médical Calédonien et Polynésien, Numéro 49 Spécial IST, pages 11-13. Décembre 2007.
3. Patrois J., Goarant C., Goyard E., Harache Y., Primot P. & Bador R. (2007). Blue shrimp quarantined in New Caledonia. Genetic variability program. Global Aquaculture Advocate 10(5), 90-92
4. Goyard E., Peignon JM., Vonau V., Goarant C., *Imbert F.*, Pham D. & Patrois J (2004) Genetic Improvement of Pacific Blue Shrimp Addresses Syndrome 93 in New Caledonia. Global Aquaculture Advocate 7(2):86-87.
5. Lemonnier H., Bernard E., Boglio E., Goarant C. & Cochard JC (2004) Sediment Quality Affects Shrimp Physiology in New Caledonia Research. Global Aquaculture Advocate 7(5):86-87.
6. Bador R. & Goarant C. (2000) En Nueva Caledonia, una enfermedad compleja del camarón azul. Panorama Acuicola, May/june 2000, p.48.

I.D.7. Colloques, congrès, conférences et posters

Présentations orales

1. Le Roux F, Labreuche Y, Xue H, Goarant C, Iqbal N, *Vic M*, *Reynaud Y*, Saulnier D, Mangenot S, Médigue C, Polz M, Waldor M & Mazel D. (2009) Molecular mechanisms in emergence of *Vibrio nigrripulchritudo* as a shrimp pathogen. Vibrio 2009, Rio de Janeiro, Brazil, 4-6 Novembre 2009. Keynote lecture. Book of abstract, page 48.
2. Majorel C., Maggia L., Wabete N., Goarant C., Lebrun M., Amir H. & Angue J-C. (2009) La Plate-Forme du Vivant de Nouvelle-Calédonie : un outil régional performant pour la recherche dans les Sciences du Vivant. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 65.
3. Goarant C., Vernel-Pauillac F., Guigon A., *Perez J.*, Brescia F., Picardeau M., Nato F. & Chanteau S. (2009) Leptospirosis as a major public health concern in New Caledonia: the need for a multidisciplinary approach. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 74.
4. Goyard E., Ansquer D., Brun P., *de Decker S.*, Dufour R., Goarant C., *de Lorgeril J.*, Patrois J., Peignon JM., Pham D. & Harache Y. (2005) : Breeding & Genetics in the New Caledonian prawn industry based on *Litopenaeus stylirostris*. Rideley Aqua-Feed Australian Prawn & Barramundi Conference. Brisbane, Août 2005.

5. Mugnier C., Patrois J., **de Decker S.** & Goarant C. (2004) Interaction between *Vibrio* infection and stress on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. World Aquaculture Society. Book of abstracts Australasian Aquaculture 2004. p. 210.
6. Lemonnier H., Boglio E., Goarant C., Legrand A. & Cochard J-C. (2004) Influence of sediment characteristics on prawn physiology: pH as principal effect. World Aquaculture Society Annual Conference, Hawaii, Book of abstracts p. 346.
7. Goyard E., Peignon JM., Goarant C., **Imbert F.**, Pham D. & Patrois J. (2004) Selection for resistance to *Vibrio penaeicida* in the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference 2004. p. 235.
8. Goyard E., Coatanéa D., Goarant C., Peignon JM., Patrois J., Pham D. & Harache Y (2004) Integrating a genetic approach into the new caledonian shrimp industry for biological and economical sustainability: past, present and future. World Aquaculture Society. Book of abstracts Australasian Aquaculture 2004. p. 146.
9. **de Lorgeril J., Janech M.**, Goarant C., Goyard E., Bo D., Xiang J., Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Bachère E. & Piquemal D. (2004) Analyse of immune gene expression in shrimps: a tool for health monitoring or genetic selection. European Aquaculture Society. Book of abstracts of the Aquaculture Europe 2004, p. 284.
10. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., Herbland A. & Harache Y. (2003). A multidisciplinary approach of the summer syndrome in New Caledonian shrimp farming. World Aquaculture Society. Book of abstracts Asian Pacific Aquaculture 2003. pp. 138. 2003.
11. Saulnier D., Goarant C., Charlier J., Ansquer D., Levy P., Labreuche Y., **de Lorgeril J.**, Bachère E., Aguirre-Guzman G. & Cochenec-Laureau N (2003) Intérêts d'un modèle d'infection de crevettes naïves par une bactérie pathogène, *Vibrio penaeicida* : étude de la pathogénie ; confirmation et caractérisation de facteurs de virulence et recherche des mécanismes de défense de l'hôte. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
12. Primot P., Herlin J., Ferré O., Sadonès H., **Domalain D.** & Goarant C. (2003) Stratégies d'épidémiologie et d'épidémiologie pour la filière crevette de Nouvelle-Calédonie : présentation des résultats de la campagne 2002. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
13. **Lefèvre J.**, Lemonnier H., Goarant C. & Blanchot J. (2003) Evolution des paramètres biologiques et physico-chimiques des bassins d'élevage de crevette avant et pendant des mortalités de type syndrome 93. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
14. Herbland A., Goarant C., Lemonnier H. & Mugnier C. (2003) Synthèse sur l'approche pluridisciplinaire du syndrome d'été (programme DeSanS). Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
15. Goarant C., Herlin J., Ansquer D., **Imbert F.** et le personnel du LAC (2003) Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été : résultats préliminaires du programme DeSanS. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
16. Goarant C., Herlin J. & Ansquer D (2003) *Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
17. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., Herbland A. & Harache Y (2003) A multidisciplinary approach of the summer syndrome in New Caledonian shrimp farming. World Aquaculture Society. Book of abstracts Asian Pacific Aquaculture 2003. pp. 138. 2003.
18. AQUACOP, Cuzon G., Robin J., Goarant C. & Saulnier D. (1999) Incidence of red heads during shrimp processing: a nutritional origin? Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference (1999). p.194.
19. Le Moullac G., **Phillip de Laborie L.** & Goarant C. (1998) Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulation on juvenile shrimp. Memorias IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola 15 al 18 de Noviembre de 1998, La Paz, BCS, México.
20. Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Berthe F., Costa R. & Mermoud I (1996) "Syndrome 93 in New Caledonia" : Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps, Seafdec. pp. 46-47.

21. Le Groumellec M., Haffner P., Goarant C. & Berthe, F. (1995). Bacterial challenges on Penaeid Shrimp. International Workshop on shell disease in marine invertebrates : environment-host-pathogen interaction, Brest, mars 1995 (Proceedings, p 29)

Posters

1. Guigon A., Vernel-Pauillac F., **Perez J.**, Chanteau S., & Goarant C. (2009) The 2008 leptospirosis epidemic in New Caledonia: weather context, diagnosis, burden of disease and future research. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 289.
2. Goyard E., Goarant C., Brun P., Herlin J., Pham D., Beliaeff B., Harache Y., Loubersac L., & Patrois J. (2009) Genetic improvement strategy in small aquaculture industries : the New Caledonian shrimp experience. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 284.
3. Vernel-Pauillac F, Goursaud R, Mérien F, Nicholas R, Tapsall J, & Goarant C. (2009) Phenotypic and molecular study of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* collected by a New Caledonian sentinel network. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 290.
4. Nandi, S., Zhao, S., Vernel-Pauillac, F., Goarant, C., & R. Nicholas. (2008). Identification of novel *mtrR* and *penB* mutations in *N. gonorrhoeae* isolates from New Caledonia. Presented at the 16th International Pathogenic Neisseria Conference, Rotterdam, 7-12 september 2008.
5. Walling E., Ansquer D., Vourey E., & Goarant C. (2008) Shrimp pathogen detection in the farming environment : Analysis of pond water and sediment samples using molecular tools. Book of abstracts Seventh Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 22-26 june 2008, Taipei, Taiwan.
6. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Mazel D., Goarant C., & Le Roux F. (2007) Identification of a plasmid associated with virulence in *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Book of abstracts Vibrio 2007.
7. **de Decker S.**, Ansquer D., & Goarant C. (2006) *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the cultured shrimp in New Caledonia: virulence, physiology and epidemiology. Poster, World Aquaculture Society, Firenze, Book of Abstracts, p.228.
8. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Goarant C., & Le Roux F. (2006) Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a *Litopenaeus stylirostris* shrimp pathogen isolated in New Caledonia. Poster, World Aquaculture Society, Firenze, Book of Abstracts, p.778.
9. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Goarant C., Faury N., & Le Roux F. (2005) Searching for genetic markers of virulence in *Vibrio nigripulchritudo*, a *Litopenaeus stylirostris* shrimp pathogen isolated in New-Caledonia. Vibrio2005 November 7-8, 2005 Het Pand, Ghent, Belgium. Book of abstracts pp 115-116.
10. Goarant C., Ansquer D., Herlin J., & **de Decker S.** (2005) Epidemiology of two seasonal vibriosis in New Caledonian shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) growout ponds. Book of abstracts 6th International Crustacean Congress. pp. 182. University of Glasgow, editor. International Crustacean Council. 2005.
11. **de Lorgeril J.**, **Janech M.**, Goarant C., Goyard E., Bo D., Xiang J., Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Bachère E., & Piquemal D. (2004) Analyse of immune gene expression in shrimps: a tool for health monitoring or genetic selection. European Aquaculture Society. Book of abstracts of the Aquaculture Europe 2004, p. 284.
12. Herbland A., Goyard E., Goarant C., Chim L., Lemonnier H., Patrois J., Coatanea D., Herlin J., Harache Y., & Martin JLM. (2004) : Aquaculture de crevettes et durabilité : l'exemple Calédonien. Colloque Bordeaux Aquaculture, septembre 2004.
13. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., Herbland A., & Harache Y, (2004). Approche pluridisciplinaire du syndrome d'été affectant la crevetticulture calédonienne dans le cadre du programme Desans. Assises de la Recherche Française dans le Pacifique, 24-27 août 2004, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
14. Lemonnier H., Boglio E., Goarant C., Legrand A., & Cochard J-C. (2003) Influence of sediment characteristics on shrimp physiology: pH as a principal effect. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
15. Goarant C., & Saulnier D. (1999). Syndrome 93 in New Caledonia: Research review and perspectives. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference (1999). p.289.

16. Saulnier D., Goarant C., Le Moullac G., Avarre J-C., Levy P., & Ansquer D. (1999). Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* strain AM 101 isolated from New Caledonia. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference (1999). p.678.
17. Goarant C., Boglio E., Lemonnier H., & Della Patrona L. (1997). Shrimp disease "Syndrome 93" in New Caledonia: The effects of water exchange rates on the bacterial flora of shrimp ponds and on shrimp survival; and selection of disease-resistant animals : Preliminary results. Book of abstracts du congrès de l'EAS, Martinique, Mai 1997. p. 143
18. Goarant C., Mermoud I., Costa R., Haffner P., & Boglio E. (1996) Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia : I. Biotechnical impact and gross signs in diseased prawns. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference (1996). pp. 139-140.
19. Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Mermoud I., & Costa R. (1996). Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia : IV. Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference (1996). pp. 144.
20. Boglio E. & Goarant C. (1996). Haemolymph magnesium as a measure of acute physiological stress in wild broodstock *Penaeus monodon* and cultured broodstock *Penaeus stylirostris*. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps, Seafdec. p 101.
21. Mermoud I., Costa R., Goarant C., & Haffner P. (1996). Mortalities observed in cultured *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps, Seafdec. p 45.
22. Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Berthe F., Costa R., & Mermoud I. (1996) "Syndrome 93 in New Caledonia" : Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps, Seafdec. pp. 46-47.

I.D.8. Rapports de projets et rapports référencés

1. Gourinat AC, **Perez J**, Guigon A, Goarant C. (2010) Bilan de la surveillance de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie et la région du Pacifique insulaire, année 2009. in Rapport annuel 2008 d'activités du Centre National de Référence de la Leptospirose.
2. Guigon A, Goarant C. (2009) Bilan de la surveillance de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie et la région du Pacifique insulaire, année 2008. in Rapport annuel 2008 d'activités du Centre National de Référence de la Leptospirose.
3. Le Roux F, Nicolas JL, Goarant C, Saulnier D, Jacq A, Paillard C, & Mazel D. (2007) Approches de génomique soustractive et de post-génomique pour l'identification de gènes de virulence de *Vibrio* pathogènes d'espèces aquacoles. Rapport final du contrat GIS génopole ouest (2004-2007), 40 p.
4. Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Broutoi F, Brun P, **de Decker S**, Dufour R, Galinié C, Mailliez JR, Peignon JM, Pham D, Vourey E, Harache Y, & Patrois J. (2007) Introduction en Nouvelle-Calédonie de la souche de crevette *Litopenaeus stylirostris* domestiquée à Hawaii : Bilan de l'opération après deux années de testage de performances des crevettes de types génétiques « Calédoniennes », « Hawaïennes » et « Hybrides ». Rapport Scientifique et Technique Ifremer/DAC/RST 2007-01.
5. Le Roux F, Saulnier D, Nicolas JL, Paillard C, Goarant C, Faury N, Garnier M, & Ansquer D (2004) Développement d'une collection de vibrions pathogènes d'espèces marines d'intérêt aquacole. Rapport Interne IFREMER DRV / RST / RA. Rapport de fin de contrat d'une opération financée par un contrat du Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation et de la Recherche, Décision d'aide n°02G0643.
6. Goarant C, Herlin J, Ansquer D, **Domalain D**, **Imbert F**, & Marteau AL. (2003). Bases des connaissances sur l'épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo*, agent étiologique du Syndrome d'été chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Rapport IFREMER DRV/RST/RA/LAC 2003-02.
7. Goyard E, Goarant C, Bachère E, **de Lorgeril J**, Mugnier C, Ansquer D, Broutoi F, Brun P, **Imbert F**, Justou C, Mailliez JR, Patrois J, Pham D, & Peignon JM. (2003). Amélioration génétique expérimentale

de la crevette d'élevage de Nouvelle-Calédonie : Sélection d'une population de *L. stylirostris* résistante à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida*. Rapport IFREMER DRV/RST/RA/LAC 2003-14.

8. Goyard E, Arnaud S, Vonau V, Bischoff V, Mouchel O, Goguenheim J, Goarant C, Pham D & AQUACOP (2002) Évaluation de la variabilité génétique de *P. stylirostris* disponible en Nouvelle-Calédonie. Rapport IFREMER DRV/RST/RA/COP 2002-02.

I.D.9. Présentations à workshops / groupes de travail

1. Goarant C, & Gourinat AC. (2010) La surveillance de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie et les activités de recherche à l'IPNC. Atelier des territoires Français du Pacifique, Nouméa, 22-25 février 2010.
2. Goarant C, & Gourinat AC. (2010) Les outils diagnostiques de la leptospirose. Atelier des territoires Français du Pacifique, Nouméa, 22-25 février 2010.
3. Goursaud R, Goarant C, & Gourinat AC. (2009) Pandémie de Grippe A/H1N1v et rôle du laboratoire de référence : Leçons apprises en Nouvelle-Calédonie pendant l'hiver Austral. Communication orale à « IP H1N1v meeting: H1N1 what is at stake? ». 3 & 4 Septembre 2009, Institut Pasteur de Paris.
4. Goarant C, **Reynaud Y**, Ansquer D, **de Decker S**, & Merien F (2007) The multiple challenges for quantifying pathogenic Vibrios in a marine aquaculture system. Roche User Group, Taupo, New Zealand, 1-3 november 2007.
5. Goarant C, **de Decker S**, Ansquer D et coll. (2006) : Travaux en pathologie dans le cadre du programme DeSanS. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.
6. Goarant C, **de Decker S**, Ansquer D, **Reynaud Y**, & Herlin J (2006) : Proposition d'un programme de surveillance de *Vibrio nigripulchritudo* et du Syndrome d'été dans les fermes de grossissement de crevettes de Nouvelle-Calédonie. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.
7. **de Decker S**, Ansquer D, Goyard E, & Goarant C (2005) Virulence specificity of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for farmed shrimp in New Caledonia. DIPNet Newsletter 23, lettre d'information du programme européen Disease Interactions and Pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations, a european NETwork, 2 pages. (http://www.dipnet.info/newsletters/NL_23.pdf)
8. Goarant C, Ansquer D, Pham D, & Mailliez JR (2005) Hatching-Survival rates of *Litopenaeus stylirostris* exposed to different concentrations of Antimicrobial Peptides. EC project Immunaqua final meeting, Montpellier, 1-2 Juillet 2005.
9. Goarant C, Ansquer D, **de Decker S** & Herlin J. (2005) : Développement des Vibrio pathogènes dans le milieu – épidémiologie. Atelier « Écosystèmes et Crevetticulture en Nouvelle-Calédonie », 22-24 Juin 2005, IRD Nouméa. Communication orale.
10. Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Brun P, **de Decker S**, Patrois J, Peignon JM, & Pham D. (2005) Survival in rearing ponds affected by the « Syndrome 93 » as a selection criteria in the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. EC project Immunaqua final meeting, Montpellier, 1-2 Juillet 2005.
11. Goarant C, Ansquer D, Pham D, & Mailliez JR (2005) Hatching-Survival rates of *Litopenaeus stylirostris* exposed to different concentrations of Antimicrobial Peptides. EC project Immunaqua final meeting, Montpellier, 1-2 Juillet 2005.
12. Goarant C, Ansquer D, **de Decker S**, & Herlin J (2005) Développement des Vibrio pathogènes dans le milieu – épidémiologie. Atelier « Écosystèmes et Crevetticulture », 22-24 Juin 2005, IRD Nouméa.
13. Paillard C, Gouletquer P, Vigneule M, Nicolas JL, Goarant C, & Le Roux F (2004) le CRB : Constitution d'une Collection de bactéries pathogènes d'espèces marines aquacoles (Financements CNRS, Ministère de la Recherche et Ifremer (2002-2004)). Pérennisation de la collection après accomplissement du projet. Présentation à la Commission Valorisation sur les projets souchothèques de l'IUEM-UBO. Novembre 2004.
14. Le Groumellec M, Haffner P, Goarant C, & Berthe F (1995) Bacterial challenges on Penaeid Shrimp. International Workshop on shell disease in marine invertebrates : environment-host-pathogen interaction,

Brest, mars 1995.

I.D.10. Recherches de financement

- 2009.** Goarant C (coordinateur) Mise en place d'un groupe de recherche sur la leptospirose dans le RIIP : méthodes diagnostiques, importance en santé publique. Demande de financement à la Direction des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur. Financement obtenu.
- 2008.** Goarant C (coordinateur) Mise au point et validation d'un Test de Diagnostic Rapide de la Leptospirose. Demande de financement au Secrétariat d'État à l'Outre Mer. Financement obtenu.
- 2008.** Goarant C (coordinateur) Mise au point et validation d'un Test de Diagnostic Rapide de la Leptospirose. Demande de financement à la Direction des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur, appel d'offre ACIP 2008. Financement obtenu.
- 2008.** Goarant C (coordinateur) Opportunités et bénéfices possibles de l'acquisition d'une plateforme de PCR quantitative à débit accru pour les activités de santé publique et de recherche. Financement obtenu.
- 2006.** Goarant C (coordinateur) Purification et caractérisation d'exotoxines de *Vibrio* pathogènes de crevettes en Nouvelle-Calédonie. Demande de financement au Secrétariat d'État à l'Outre Mer. Financement obtenu.
- 2000.** Goarant C (coordinateur) Recherche de bactériophages associés aux *Vibrio* pathogènes de crevettes. Collaboration avec la James Cook University, Townsville, Queensland, Australia. Demandes de financements au Fonds Pacifique et à l'Agence Française de Développement. Financements obtenus.

I.E. Collaborations

La plupart des travaux menés m'ont amené à établir des collaborations externes à mon laboratoire d'affectation. Parmi les collaborateurs je ne citerai ici que les responsables d'équipes, même si le travail mené avec ces équipes impliquait un nombre plus important de personnes :

Au cours de mon affectation à l'Ifremer :

- Dr E. Bachère, Ifremer, CNRS, Université de Montpellier II, UMR 5119 Ecosystèmes Lagunaires, Montpellier, France.
- Dr F. Berthe, Ifremer, Laboratoire Génétique et Pathologie et Laboratoire de Référence de l'OIE sur les maladies des Mollusques, La Tremblade, France.
- Dr F. Le Roux, Ifremer, Laboratoire Génétique et Pathologie, La Tremblade, France puis Unité Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA 2171, Institut Pasteur, Paris, France.

- Pr D. Lightner, Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, et Laboratoire de Référence de l'OIE sur les maladies des Crustacés, Tucson, Arizona, USA.
- Dr D. Mazel, Unité Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA 2171, Institut Pasteur, Paris, France.
- Dr F. Mérien, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.
- Pr L. Owens, School of Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, Townsville, Queensland, Australia.
- Dr P. Pérolat, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.
- Dr D. Saulnier, Ifremer, Centre Océanologique du Pacifique, Vairao, Tahiti, Polynésie Française puis Laboratoire Génétique et Pathologie, La Tremblade, France.

Au cours de mon affectation à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie :

- A Amadou, CERMES, Institut membre du Réseau International des Instituts Pasteur, Niamey, Niger.
- Dr Franck BERGER unité d'épidémiologie, Institut Pasteur de Guyane
- Dr Pascal Boisier, laboratoire d'épidémiologie et de santé publique, Centre Pasteur du Cameroun
- F. Brescia, Institut Agronomique néo-Calédonien.
- Dr B. Guillard, Institut Pasteur du Cambodge.
- Dr S. Guyomard-Rabenirina, laboratoire d'analyses biologiques et médicales, Institut Pasteur de Guadeloupe
- Dr A. Ko, Médecin chercheur, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA et Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brésil
- Dr K. Kouadio, Médecin Environnementaliste, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
- Dr F. Nato, Institut Pasteur, Plateforme 5 Module production d'Anticorps Monoclonaux, Paris, France.
- Pr R. Nicholas, University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina, USA.
- Dr M. Picardeau, Institut Pasteur de Paris, Unité de Biologie des Spirochètes et Centre National de Référence de la leptospirose.
- Dr A. Talarmin, Institut Pasteur de Madagascar.
- Pr J. Tapsall, WHO Collaborating Centre for STD and HIV, Department of Microbiology, The Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia.

Ces collaborations se sont parfois faites dans le cadre de projets ayant donné lieu à des financements spécifiques et ayant conduit à la rédaction de rapports de contrats. Parmi ceux-ci, je citerai les suivants :

2009-2011. Programme « Mise en place d'un groupe de recherche sur la leptospirose dans le RIIP : méthodes diagnostiques, importance en santé publique ». Collaborations avec le Centre National de Référence de la Leptospirose, l'unité Biologie des Spirochètes de l'IP Paris et 5 instituts du Réseau International des Instituts Pasteur (Cambodge, Cameroun, Cote d'Ivoire, Guyane et Guadeloupe) pour mettre en place et standardiser les techniques diagnostiques (sérologiques et moléculaires) de la leptospirose. Coordination des actions, référence pour le diagnostic moléculaire et relations avec la Direction des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur, bailleur du programme.

2008-2009. Programme « Mise au point et validation d'un Test de Diagnostic Rapide de la Leptospirose ». Collaborations avec le Centre National de Référence de la Leptospirose, l'unité Biologie des Spirochètes de l'IP Paris, le module « production d'anticorps » de la plateforme 5 de l'IP Paris et le CERMES, institut nigérien membre du Réseau International des Instituts Pasteur. Coordination des actions et relations avec le Secrétariat d'État à l'Outre Mer et la Direction des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur, bailleurs du programme.

2008-2009. ACIP « Mutations ponctuelles au sein des gènes *ponA* et *penA* de *Neisseria gonorrhoeae* liées à une sensibilité diminuée à la pénicilline : mise en place d'une surveillance moléculaire par PCR en temps réel dans plusieurs zones géographiques. ». Ce projet a été initié et coordonné par le LRB de l'IPNC. Collaborations avec l'IP Madagascar et l'IP Cambodge, relations avec la Direction des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur, bailleur du programme.

2003-2006. DéSanS : Défi Santé *stylirostris* : Programme de recherche quadriennal de l'Ifremer-Nouvelle-Calédonie visant à comprendre et prévenir les phénomènes de mortalité saisonnière des crevettes d'élevage. Coordination des actions liées à la collecte et l'archivage de souches issues des crustacés.

2002-2005 : Programme Européen : Immunaqua INCO-DEV (ICA4-2000-10236) "Antimicrobial immune effectors in marine invertebrates: characterisation and application for disease control in aquaculture". Coordination des actions de l'Ifremer Nouvelle-Calédonie dans le cadre de ce programme.

2002-2004. Approches de génomique soustractive et de post-génomique pour l'identification de gènes de virulence de *Vibrio* pathogènes d'espèces aquacoles. GIS "Institut de la Génomique Marine". Coordination des actions concernant les *Vibrio* pathogènes de crevettes, *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo*.

2002-2004. CRB : Développement d'une collection de vibrions pathogènes d'espèces marines

d'intérêt aquacole. Demande de financement par un contrat du Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation et de la Recherche. Coordination des actions liées à la collecte et l'archivage de souches issues des crustacés.

2002. Recherche de bactériophages associés à la virulence chez les *Vibrio* pathogènes des crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Collaboration Ifremer Nouvelle-Calédonie et James Cook University, Townsville, Australia. Financement par le Fonds Pacifique et l'Agence Française de Développement.

I.F. Encadrement et enseignement

I.F.1. Encadrement d'équipes de recherche

Au cours de mon activité professionnelle à l'Ifremer, j'ai encadré une équipe composée de 2 à 5 titulaires (cadres débutants, techniciens supérieurs, ingénieur) incluant 5 Volontariats Civils à l'Aide Technique, ainsi qu'un certain nombre de stagiaires (cf. infra). J'ai par ailleurs assuré la mise en place d'un réseau d'épidémiosurveillance de la filière aquacole de crevettes en Nouvelle-Calédonie et assuré le transfert de sa responsabilité à l'ingénieur en charge de cette tâche pour l'Ifremer.

Depuis mon affectation à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, j'encadre une petite équipe de recherche (une ingénieure et une Volontaire Civile à l'Aide Technique de niveau Master 2) et accueille au sein de l'unité une Volontaire Civile à l'Aide Technique de l'Ifremer détachée à 4/5^e de temps à l'Institut Pasteur. En relation avec la pharmacienne biologiste responsable du secteur, je participe à l'encadrement des deux techniciennes en charge du diagnostic biologique de la leptospirose. Enfin, en tant que responsable d'unité, j'assume un rôle de référent dans le domaine de la biologie moléculaire au sein de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

Production scientifique associant les jeunes scientifiques encadrés dans ce contexte (en gras) :

Articles dans des revues à comité de lecture

1. Goarant C., Laumond-Barny S., **Perez J.**, Vernel-Pauillac F., Chanteau S. & Guigon A. (2009) Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: Diagnosis issues and Burden of Disease. Tropical Medicine and International Health. **14**: 926-929.
2. Page S., Vernel-Pauillac F., **O'Connor O.**, Bremont S., Charavay F., Courvalin P., Goarant C., & Le Hello S. (2008) RT-PCR detection of *gyrA* and *parC* mutations from *Streptococcus pneumoniae* DNA extract. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **52(11)**: 4155-4158.
3. Mugnier C., **Zipper E.**, Goarant C. & Lemonnier H. (2008) Combined effect of external ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, **274**, 398-407.
4. Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., **de Decker S.** & Mérien F. (2007). Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging clone pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. Journal of Microbiological Methods **70**, 30-38.
5. Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., **de Decker S.**, Saulnier D. & Le Roux F. (2006) Virulence and

molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 570-580.

6. Goarant C., Ansquer D., Herlin J., **Domalain D.**, **Imbert F.** & de Decker S. (2006) : "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture*, **253**, 105-113.
7. Goarant C., **Brizard R.** & Marteau AL. (2000) A white spot disease-like syndrome in the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) as a form of bacterial shell disease. *Aquaculture* **183**, 25-30.
8. Goarant C., **Herlin J.**, **Brizard R.**, Marteau AL., Martin C. & Martin B (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**,101-107
9. Goarant C., **Régnier F.**, **Brizard R.** & Marteau AL (1998) Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* **169**, 291-296.

Chapitres d'ouvrages, articles dans Actes de colloque

1. Goarant C., Vernel-Pauillac F., Guigon A., **Perez J.**, Brescia F., Picardeau M., Nato F. & Chanteau S (2009) Leptospirosis as a major public health concern in New Caledonia: the need for a multidisciplinary approach. In Proceedings of the Pacific Science Intercongress.
2. **Lefèvre J.**, Lemonnier H., Goarant C. & Blanchot J. (2004) Évolution des paramètres physico-chimiques et biologiques de bassins d'élevage de crevette soumis à deux régimes de renouvellements en eau avant et pendant des mortalités de type « Syndrome 93 ». In : Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38. p 158-166
3. Goarant C., Herlin J., Ansquer D., **Brizard R.** & Marteau AL. (2004). *Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 203-209.
4. Goarant C., Herlin J., Ansquer D., **Imbert F.**, **Domalain D.** & Marteau AL. (2004). Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été : résultats préliminaires du programme DESANS. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 210-215.
5. Primot P., **Herlin J.**, Ferré O., Sadonès H., **Domalain D.** & Goarant C. (2004). Stratégies d'épidémiosurveillance et d'épidémiogigilance pour la filière crevettes de Nouvelle-Calédonie : présentation des résultats de la campagne 2002. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 229-235.
6. Le Moullac G., **Phillip de Laborie L.**, Saulnier D., Goarant C. & Dehasque M. (1998) Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. Memorias IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola 15 al 18 de Noviembre de 1998, La Paz, BCS, México, pp. 1-10.

Articles à destination des professionnels

1. Goyard E., Peignon JM., Vonau V., Goarant C., **Imbert F.**, Pham D. & Patrois J (2004) Genetic Improvement of Pacific Blue Shrimp Addresses Syndrome 93 in New Caledonia. *Global Aquaculture Advocate* 7(2):86-87.

Colloques, congrès, conférences : Présentations orales

1. Goarant C., Vernel-Pauillac F., Guigon A., **Perez J.**, Brescia F., Picardeau M., Nato F. & Chanteau S. (2009) Leptospirosis as a major public health concern in New Caledonia: the need for a multidisciplinary approach. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 74.
2. Mugnier C., Patrois J., **de Decker S.** & Goarant C. (2004) Interaction between *Vibrio* infection and stress on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. World Aquaculture Society. Book of abstracts Australasian Aquaculture 2004. p. 210.
3. Goyard E., Peignon JM., Goarant C., **Imbert F.**, Pham D. & Patrois J. (2004) Selection for resistance to *Vibrio penaeicida* in the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference 2004. p. 235.
4. Primot P., Herlin J., Ferré O., Sadonès H., **Domalain D.** & Goarant C. (2003) Stratégies d'épidémiosurveillance et d'épidémiogigilance pour la filière crevette de Nouvelle-Calédonie : présentation des résultats de la campagne 2002. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-

Calédonie.

5. **Lefèvre J.**, Lemonnier H., Goarant C. & Blanchot J. (2003) Evolution des paramètres biologiques et physico-chimiques des bassins d'élevage de crevette avant et pendant des mortalités de type syndrome 93. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
6. Goarant C., Herlin J., Ansquer D., **Imbert F.** et le personnel du LAC (2003) Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d'été : résultats préliminaires du programme DeSanS. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
7. Le Moullac G., **Phillip de Laborie L.** & Goarant C. (1998) Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulation on juvenile shrimp. Memorias IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola 15 al 18 de Noviembre de 1998, La Paz, BCS, México.

Colloques, congrès, conférences : Posters

1. Guigon A., Vernel-Pauillac F., **Perez J.**, Chanteau S., & Goarant C. (2009) The 2008 leptospirosis epidemic in New Caledonia: weather context, diagnosis, burden of disease and future research. Eleventh Pacific Science Inter-congress, 02 – 06 March 2009, Tahiti – French Polynesia. Book of abstracts page 289.
2. **de Decker S.**, Ansquer D., Goarant C. (2006) *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the cultured shrimp in New Caledonia: virulence, physiology and epidemiology. Poster, World Aquaculture Society, Firenze, Book of Abstracts, p.228.
3. Goarant C., Ansquer D., Herlin J., & **de Decker S.** (2005) Epidemiology of two seasonal vibriosis in New Caledonian shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) growout ponds. Book of abstracts 6th International Crustacean Congress. pp. 182. University of Glasgow, editor. International Crustacean Council. 2005.

Rapports de projets et rapports référencés

1. Goarant C, Herlin J, Ansquer D, **Domalain D**, **Imbert F**, & Marteau AL. (2003). Bases des connaissances sur l'épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo*, agent étiologique du Syndrome d'été chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Rapport IFREMER DRV/RST/RA/LAC 2003-02.
2. Goyard E, Goarant C, Bachère E, de Lorgeril J, Mugnier C, Ansquer D, Broutoi F, Brun P, **Imbert F**, Justou C, Mailliez JR, Patrois J, Pham D, & Peignon JM. (2003). Amélioration génétique expérimentale de la crevette d'élevage de Nouvelle-Calédonie : Sélection d'une population de *L. stylirostris* résistante à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida*. Rapport IFREMER DRV/RST/RA/LAC 2003-14.

Présentations à workshops / groupes de travail :

1. Goarant C, Reynaud Y, Ansquer D, **de Decker S**, & Merien F (2007) The multiple challenges for quantifying pathogenic Vibrios in a marine aquaculture system. Roche User Group, Taupo, New Zealand, 1-3 november 2007.
2. Goarant C, **de Decker S**, Ansquer D et coll. (2006) : Travaux en pathologie dans le cadre du programme DeSanS. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.
3. Goarant C, **de Decker S**, Ansquer D, **Reynaud Y**, & Herlin J (2006) : Proposition d'un programme de surveillance de *Vibrio nigripulchritudo* et du Syndrome d'été dans les fermes de grossissement de crevettes de Nouvelle-Calédonie. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.
4. **de Decker S**, Ansquer D, Goyard E, & Goarant C (2005) Virulence specificity of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for farmed shrimp in New Caledonia. DIPNet Newsletter 23, lettre d'information du programme européen Disease Interactions and Pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations, a european NETWORK, 2 pages. (http://www.dipnet.info/newsletters/NL_23.pdf)
5. Goarant C, Ansquer D, **de Decker S**, & Herlin J. (2005) : Développement des Vibrio pathogènes dans le milieu – épidémiologie. Atelier « Écosystèmes et Crevetticulture en Nouvelle-Calédonie », 22-24 Juin 2005, IRD Nouméa. Communication orale.

I.F.2. Encadrement de Masters (DEA, DESS)

1997

Jérôme Lefèvre, DESS Environnement, Sols, Eaux continentales et Eaux Marines, Université de Caen et Rouen. Co-encadrement avec l'équipe environnement de l'Ifremer et OJ. Blanchot, IRD Nouméa.

Lefèvre J. (1997). Dynamique des communautés phytoplanctoniques dans des bassins d'élevage de crevettes en saison froide, en relation avec les épisodes de mortalité du " syndrome 93 ". Rapport de stage du DESS Environnement, Sols, Eaux continentales et Eaux Marines, Université de Caen et Rouen. 140 p.

Patrick Lapouyade, DESS Exploitation des ressources vivantes côtières, Laboratoire de biologie et biotechnologies marines, Université de Caen. Co-encadrement avec l'équipe éclosion de l'Ifremer.

Boher F, Cadet P, & **Lapouyade P.** 1996. Etude bibliographique sur les pathologies des pénéides : description des pathologies/système immunitaire/prophylaxie et diagnostic. DESS "Exploitation des ressources vivantes côtières", Laboratoire de biologie et biotechnologies marines, Université de Caen, 87 pp.

Lapouyade P. 1996. Recherches d'accompagnement en zootechnie crevettes et conditions favorisant le syndrome 93. Validation d'un nouvel antibiotique en élevage larvaire. DESS "Exploitation des ressources vivantes côtières", Laboratoire de biologie et biotechnologies marines, Université de Caen, 67 pp + annexes.

2004

Yann Reynaud, DEA Océanologie Biologique et Environnement Marin. 3 mois en 2004. Co-encadrement avec JL Nicolas du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés de l'Ifremer de Brest et l'équipe éclosion de l'Ifremer de Nouvelle-Calédonie.

Reynaud, Y. (2004) : Utilisation de bactéries probiotiques comme substituts aux antibiotiques, en élevage larvaire de crevette *Litopenaeus stylirostris*. 34 pages.

Sophie de Decker, DEA Exploitation Durable des Ecosystèmes - Université de La Rochelle. 5 mois en 2004. Co-encadrement avec les équipes physiologie et génétique de l'Ifremer de Nouvelle-Calédonie.

de Decker, S. (2004) Résistance de la crevette *Litopenaeus stylirostris* à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida* : Physiologie, immunologie et pathologie comparées d'une population sélectionnée sur un critère de survie aux épisodes de mortalité et d'une population témoin non sélectionnée. 64 pages.

de Decker, S. (2004) L'aquaculture de crevettes : Pathologies et solutions envisageables. 16 pages.

Production scientifique associant les jeunes scientifiques encadrés dans ce contexte (en gras) :

Articles dans des revues à comité de lecture

1. Goyard E., Goarant C., Ansquer D., Broutoi F., Brun P., **de Decker S.**, Dufour R., Galinié C., Mailliez JR., Peignon JM., Pham D., Vourey E., Patrois J. & Harache Y. (2008) A case study of R&D for small isolated aquaculture industries: genetic management of the domesticated *Litopenaeus stylirostris* shrimp population of New Caledonia. Aquaculture Europe **33(2)**: 5-11.
2. Goyard E., Goarant C., Ansquer D., Brun P., **de Decker S.**, Dufour R., Galinié C., Peignon JM., Vourey E., Harache Y. & Patrois J. (2008) Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture **278**:43-50.
3. Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., **de Decker S.** & Mérien F. (2007). Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging clone pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. Journal of Microbiological Methods **70**, 30-38.
4. Goarant C., Reynaud Y., Ansquer D., **de Decker S.**, Saulnier D. & Le Roux F. (2006) Virulence and molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Systematic and Applied Microbiology **29**, 570-580.
5. Goarant C., Ansquer D., Herlin J., Domalain D., Imbert F. & **de Decker S.** (2006) : "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture, **253**, 105-113.

Chapitres d'ouvrages, articles dans Actes de colloque

1. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., **de Decker S.**, Courties C., Della Patrona L., Herbland A., Herlin J., Reynaud Y. & Ansquer D. (2008) Le Syndrome d'été. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE.
2. Goyard E., Chim L., Della Patrona L., Castex M., **de Decker S.**, Goarant C., Herbland A., Patrois J., Pham D., Wabete N. & Brun P. (2008) Sortir de la crise : recherche de solutions. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE.
3. **Lefèvre J.**, Lemonnier H., Goarant C. & Blanchot J. (2004) Évolution des paramètres physico-chimiques et biologiques de bassins d'élevage de crevette soumis à deux régimes de renouvellements en eau avant et pendant des mortalités de type « Syndrome 93 ». In : Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38. p 158-166.

Colloques, congrès, conférences : Présentations orales

1. Goyard E., Ansquer D., Brun P., **de Decker S.**, Dufour R., Goarant C., de Lorgeril J., Patrois J., Peignon JM., Pham D. & Harache Y. (2005) : Breeding & Genetics in the New Caledonian prawn industry based on *Litopenaeus stylirostris*. Rideley Aqua-Feed Australian Prawn & Barramundi Conference. Brisbane, Août 2005.
2. Mugnier C., Patrois J., **de Decker S.** & Goarant C. (2004) Interaction between *Vibrio* infection and stress on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. World Aquaculture Society. Book of abstracts Australasian Aquaculture 2004. p. 210.
3. Mugnier C., Patrois J., **de Decker S.**, & Goarant C. (2004) Interaction between *Vibrio* infection and stress on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. World Aquaculture Society. Book of abstracts Australasian Aquaculture 2004. p. 210.
4. **Lefèvre J.**, Lemonnier H., Goarant C. & Blanchot J. (2003) Evolution des paramètres biologiques et physico-chimiques des bassins d'élevage de crevette avant et pendant des mortalités de type syndrome 93. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

Colloques, congrès, conférences : Posters

1. **de Decker S.**, Ansquer D., Goarant C. (2006) *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the cultured shrimp in New Caledonia: virulence, physiology and epidemiology. Poster, World Aquaculture Society, Firenze, Book of Abstracts, p.228.
2. Goarant C., Ansquer D., Herlin J., & **de Decker S.** (2005) Epidemiology of two seasonal vibriosis in New Caledonian shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) growout ponds. Book of abstracts 6th International Crustacean Congress. pp. 182. University of Glasgow, editor. International Crustacean Council. 2005.

Rapports de projets et rapports référencés

1. Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Broutoi F, Brun P, **de Decker S**, Dufour R, Galinié C, Mailliez J-R, Peignon J-M, Pham D, Vourey E, Harache Y, & Patrois J. (2007). Introduction in New Caledonia of a population of *Litopenaeus stylirostris* domesticated in Hawaii : Report on reproduction performances of the Hawaiian population reared in New Caledonia after 2 years of testing. Ifremer/DAC/RC 2007-02, 9 pp.
2. Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Broutoi F, Brun P, **de Decker S**, Dufour R, Galinié C, Mailliez JR, Peignon JM, Pham D, Vourey E, Harache Y, & Patrois J. (2007) Introduction en Nouvelle-Calédonie de la souche de crevette *Litopenaeus stylirostris* domestiquée à Hawaii : Bilan de l'opération après deux années de testage de performances des crevettes de types génétiques « Calédoniennes », « Hawaïennes » et « Hybrides ». Rapport Scientifique et Technique Ifremer/DAC/RST 2007-01.

Présentations à workshops / groupes de travail :

1. Goarant C, Reynaud Y, Ansquer D, **de Decker S**, & Merien F (2007) The multiple challenges for quantifying pathogenic Vibrios in a marine aquaculture system. Roche User Group, Taupo, New Zealand, 1-3 november 2007.
2. Goarant C, **de Decker S**, Ansquer D et coll. (2006) : Travaux en pathologie dans le cadre du programme DeSanS. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.
3. Goarant C, **de Decker S**, Ansquer D, Reynaud Y, & Herlin J (2006) : Proposition d'un programme de surveillance de *Vibrio nigripulchritudo* et du Syndrome d'été dans les fermes de grossissement de crevettes de Nouvelle-Calédonie. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.
4. **de Decker S**, Ansquer D, Goyard E, & Goarant C (2005) Virulence specificity of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for farmed shrimp in New Caledonia. DIPNet Newsletter 23, lettre d'information du programme européen Disease Interactions and Pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations, a european NETWORK, 2 pages. (http://www.dipnet.info/newsletters/NL_23.pdf)
5. Goarant C, Ansquer D, **de Decker S**, & Herlin J. (2005) : Développement des Vibrio pathogènes dans le milieu – épidémiologie. Atelier « Écosystèmes et Crevetticulture en Nouvelle-Calédonie », 22-24 Juin 2005, IRD Nouméa. Communication orale.
6. Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Brun P, **de Decker S**, Patrois J, Peignon JM, & Pham D. (2005) Survival in rearing ponds affected by the « Syndrome 93 » as a selection criteria in the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. EC project Immunaqua final meeting, Montpellier, 1-2 Juillet 2005.
7. Goarant C, Ansquer D, **de Decker S**, & Herlin J (2005) Développement des Vibrio pathogènes dans le milieu – épidémiologie. Atelier « Écosystèmes et Crevetticulture », 22-24 Juin 2005, IRD Nouméa.

I.F.3. Accueil de post-doctorants

2007

Séverine Page. (2007). Co-encadrement. **Post-doctorante** à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, accueillie 6 mois en 2007. Mise au point d'une technique de génotypage des déterminants chromosomiques de la résistance aux quinolones chez *Streptococcus pneumoniae* par PCR en temps réel.

Page S., Vernel-Pauillac F., O'Connor O., Bremont S., Charavay F., Courvalin P., Goarant C., & Le

Hello S. (2008) RT-PCR detection of *gyrA* and *parC* mutations from *Streptococcus pneumoniae* DNA extract. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **52(11)**: 4155-4158.

2004

Mike Janech. (2004) Co-encadrement. **Post-doctorant** à l'unité mixte Ifremer – CNRS – USTL Montpellier (DRIM) après une thèse au Medical University of South Carolina (MUSC), accueilli pendant 2 mois. Infections expérimentales de larves et postlarves de *Litopenaeus stylirostris* avec la souche de *Vibrio penaeicida* AM 101. Recherche de gènes différentiellement exprimés au cours de l'ontogenèse du système immunitaire.

de Lorgeril J., **Janech M.**, Goarant C., Goyard E., Bo D., Xiang J., Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Bachère E. & Piquemal D. (2004) Analyse of immune gene expression in shrimps: a tool for health monitoring or genetic selection. European Aquaculture Society. Book of abstracts of the Aquaculture Europe 2004, p. 284. Poster.

I.F.4. Co-encadrement de doctorants

2004-2007

Yann Reynaud. Soutenue en avril 2008

Thèse en co-encadrement Ifremer La Tremblade / Ifremer Nouvelle-Calédonie et bénéficiant d'un cofinancement Ifremer – gouvernement de la Nouvelle-Calédonie.

« Recherche de facteurs de virulence exprimés par *Vibrio nigripulchritudo* pathogène de crevettes péneïdes et application à des études d'intérêt épidémiologique. »

Articles dans des revues à comité de lecture

1. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Mazel D., Goarant C. & Le Roux F. (2008) Correlation between the detection of a plasmid and high virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Applied and Environmental Microbiology. **74**: 3038-3047.
2. Goarant C., **Reynaud Y.**, Ansquer D., de Decker S. & Mérien F. (2007). Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging clone pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. Journal of Microbiological Methods **70**, 30-38.
3. Saulnier D., **Reynaud Y.**, Arzul I., Miossec L., Le Roux F. & Goarant C. (2007) Émergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples. INRA Prod. Anim. **20**, 207-212.
4. Goarant C., **Reynaud Y.**, Ansquer D., de Decker S., Saulnier D. & Le Roux F. (2006) Virulence and molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Systematic and Applied Microbiology **29**, 570-580.

Chapitres d'ouvrages, articles dans Actes de colloque

1. Goarant C., Lemonnier H., Mugnier C., de Decker S., Courties C., Della Patrona L., Herbland A., Herlin J., **Reynaud Y.** & Ansquer D. (2008) Le Syndrome d'été. In « Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie ». Ed. QUAE.

Colloques, congrès, conférences : Posters

1. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Mazel D., Goarant C., Le Roux F. (2007) Identification of a plasmid associated with virulence in *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Book of abstracts Vibrio 2007.
2. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Goarant C., & Le Roux F. (2006) Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a *Litopenaeus stylirostris* shrimp pathogen isolated in New Caledonia. Poster, World Aquaculture Society, Firenze, Book of Abstracts, p.778.
3. **Reynaud Y.**, Saulnier D., Goarant C., Faury N., & Le Roux F. (2005) Searching for genetic markers of virulence in *Vibrio nigripulchritudo*, a *Litopenaeus stylirostris* shrimp pathogen isolated in New-Caledonia. Vibrio2005 November 7-8, 2005 Het Pand, Ghent, Belgium. Book of abstracts pp 115-116.

Présentations à workshops / groupes de travail :

1. Goarant C, **Reynaud Y.**, Ansquer D, de Decker S, & Merien F (2007) The multiple challenges for quantifying pathogenic Vibrios in a marine aquaculture system. Roche User Group, Taupo, New Zealand, 1-3 november 2007.
2. Goarant C, de Decker S, Ansquer D, **Reynaud Y.**, & Herlin J (2006) : Proposition d'un programme de surveillance de *Vibrio nigripulchritudo* et du Syndrome d'été dans les fermes de grossissement de crevettes de Nouvelle-Calédonie. Communication orale à l'Atelier de Bilan et Synthèse des Travaux de Recherche Aquacole.

2002-2004

Julien de Lorgeril. Soutenue fin 2004.

Thèse en co-encadrement UMR Ifremer-CNRS-Université de Montpellier II « Drim » / Ifremer-COP Tahiti / Ifremer-DAC Nouvelle-Calédonie.

« Recherche d'effecteurs immunitaires et physiologiques intervenant dans la résistance ou la sensibilité de la crevette *L. stylirostris* à deux vibrioses sévissant en Nouvelle-Calédonie. »

Articles dans des revues à comité de lecture

1. **de Lorgeril J.**, Gueguen Y., Goarant C., Goyard E., Mugnier C., Fievet J., Piquemal D. & Bachere E. (2008). A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. Molecular Immunology. **45**: 3438-3445

Chapitres d'ouvrages, articles dans Actes de colloque

1. Saulnier D., Goarant C., Charlier J., Ansquer D., Levy P., Labreuche Y., **de Lorgeril J.**, Bachère E., Aguirre-Guzman G. & Cochenec-Laureau N. (2004). Apports d'un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves pour l'étude d'une vibriose. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 216-222.

Colloques, congrès, conférences : Présentations orales

1. Goyard E., Ansquer D., Brun P., de Decker S., Dufour R., Goarant C., **de Lorgeril J.**, Patrois J., Peignon JM., Pham D. & Harache Y. (2005) : Breeding & Genetics in the New Caledonian prawn industry based on *Litopenaeus stylirostris*. Rideley Aqua-Feed Australian Prawn & Barramundi Conference. Brisbane, Août 2005.
2. Saulnier D., Goarant C., Charlier J., Ansquer D., Levy P., Labreuche Y., **de Lorgeril J.**, Bachère E., Aguirre-Guzman G. & Cochenec-Laureau N (2003) Intérêts d'un modèle d'infection de crevettes naïves

par une bactérie pathogène, *Vibrio penaeicida* : étude de la pathogénie ; confirmation et caractérisation de facteurs de virulence et recherche des mécanismes de défense de l'hôte. Colloque Styli 2003, 2-6 juin 2003, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

Colloques, congrès, conférences : Posters

1. **de Lorgeril J., Janech M.,** Goarant C., Goyard E., Bo D., Xiang J., Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Bachère E., & Piquemal D. (2004) Analyse of immune gene expression in shrimps: a tool for health monitoring or genetic selection. European Aquaculture Society. Book of abstracts of the Aquaculture Europe 2004, p. 284.

Rapports de projets et rapports référencés

1. Goyard E, Goarant C, Bachère E, **de Lorgeril J**, Mugnier C, Ansquer D, Broutoi F, Brun P, *Imbert F*, Justou C, Mailliez JR, Patrois J, Pham D, & Peignon JM. (2003). Amélioration génétique expérimentale de la crevette d'élevage de Nouvelle-Calédonie : Sélection d'une population de *L. stylirostris* résistante à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida*. Rapport IFREMER DRV/RST/RA/LAC 2003-14.

I.F.5. Encadrement d'étudiants d'autres niveaux

2008

Guillaume Habault : stage volontaire de fin de licence, Université Claude Bernard Lyon I.

Essais d'optimisation de la PCR diagnostique de la leptospirose.

2005-2006

Olivier Brunel : stage de césure au cours d'un cursus d'ingénieur. 7 mois en 2005-2006. Mise en place d'une base de données de pathologie expérimentale sur le logiciel Access.

Participation aux activités de l'équipe pathologie. Travaux préliminaires sur la physiologie des *Vibrio* pathogènes de crevettes.

Brunel. (2006) : « StyliVib », base de données de Pathologie Expérimentale. Base de Données MS Access.

Brunel. (2006) : Rapport de stage : Contribution en pathologie pour l'étude des mortalités saisonnières dans les élevages de crevettes *Litopenaeus stylirostris*. 90 pages.

Brunel. (2006) : « Stage dans un laboratoire de recherche aquacole », Diaporama sonorisé pour la fête de la science 15 minutes.

Etienne ZIPPER, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Stage de fin d'étude de 6 mois dans le cadre de la spécialisation « aquaculture ». Co-encadrement avec les équipes éco-physiologie et environnement de l'Ifremer. Interaction de l'ammoniaque et l'hypoxie sur la physiologie de la crevette *L. stylirostris*.

Zipper E. (2005) Interaction de deux facteurs environnementaux, l'ammoniaque et l'hypoxie, sur la physiologie de la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Rapport de stage du DE

« Aquaculture, pathologie aquacole et environnement » ; Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. 42 pages.

Articles dans des revues à comité de lecture

Mugnier C., *Zipper E.*, Goarant C. & Lemonnier H. (2008) Combined effect of external ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*, **274**, 398-407.

2004

Ramona GUTIERREZ Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Stage d'initiation à la recherche. Rapport de stage : « Caractérisation du portage du virus IHHNV chez différentes lignées de crevettes *Litopenaeus stylirostris* ».

Laurent FILLON Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Stage d'initiation à la recherche. Rapport de stage : « Essais d'isolement et d'identification de souches environnementales de *Vibrio penaeicida* ».

Hugues GOSSUIN, Intechmer. 4 mois en 2004. Co-encadrement avec l'équipe physiologie du LAC. Rapport de stage : « Suivi in situ d'un élevage de crevettes en Nouvelle-Calédonie exposé au Syndrome 93. ».

2003

Cyrille FRANÇOIS, École Nationale Vétérinaire de Nantes. 6 mois en 2003. Co-encadrement avec l'équipe éclosion du LAC. Stage de fin d'études ayant débouché sur la rédaction d'une thèse vétérinaire.

François C. (2003) : États des lieux biologique et réglementaire de l'utilisation d'antibiotiques en éclosiers d'invertébrés. Rapports intermédiaires, 12 et 25 pages. Présentations orales au Groupement des Fermes Aquacoles.

François C. (2003) : Recherche d'un antibiotique préventif de substitution à l'érythromycine en éclosion de crevettes. Rapport de stage de fin d'études DE « Aquaculture, Pathologie Aquacole et Environnement ». 70 pages.

François C. (2003) : L'élevage larvaire de crevettes en Nouvelle-Calédonie. L'oxytétracycline et l'association Triméthoprime – Sulfadiazine en tant qu'alternatives à l'emploi de l'érythromycine en éclosion. Thèse pour le diplôme de docteur vétérinaire. 112 pages.

Guillaume MERLAUT, ISTOM. 8 mois en 2002. Co-encadrement avec l'équipe éclosion du LAC. Travaux préliminaires sur la recherche d'un antibiotique préventif de substitution à l'érythromycine en éclosion de crevettes. Rapport de stage. 44 pages.

Merlaut, G. (2002). Substitution de l'érythromycine par le Tribissen en élevage larvaire de la crevette *Penaeus stylirostris*. Rapport de stage de fin d'étude ISTOM.

I.F.6. Rédaction de supports pédagogiques, formations, enseignement

Enseignement dans le cadre du DEUST aquaculture de l'UNC : L'aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie et la Station Ifremer de Saint Vincent. Maladies des crevettes en élevage, techniques d'études. Enseignement théorique de 4 heures en 1999.

Séquences de formation des personnels techniciens de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie sur la PCR en temps réel et ses applications : PCR quantitative, études d'expression génique, génotypage.

Référent sur la biologie moléculaire au sein de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

Préparation de plaquettes, posters et documents d'information pour les événements publics : fête de la science, fête du cerf et de la crevette,... sur divers sujets, notamment

- Le diagnostic bactériologique en aquaculture de crevettes. Préparation de démonstrations pour la fête de la science.
- Les *Vibrio* et les maladies des crevettes en élevage. Fascicule.
- Histoire de la PCR et technique : de la PCR conventionnelle à la PCR en temps réel. Poster.
- La leptospirose en Nouvelle-Calédonie : diagnostic et travaux de recherche de l'Institut Pasteur. Poster.
- La leptospirose en Nouvelle-Calédonie : travaux de recherche à l'Institut Pasteur. Conférence à l'occasion de l'exposition sur les 120 ans de l'Institut Pasteur à la mairie de Nouméa.

I.F.7. Jury de thèse

Examineur du jury de thèse de **Julien de Lorgeril** : Recherche d'effecteurs immunitaires et physiologiques intervenant dans la résistance ou la sensibilité de la crevette *L. stylirostris* à deux vibrioses sévissant en Nouvelle-Calédonie.

II. Résumé des travaux antérieurs

II.A. Résumé des travaux au cours de la thèse

Article 1 : Les crevettes ne sont pas affectées avant un certain stade de développement.



Aquaculture 169 (1998) 291–296

Aquaculture

Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles

Cyrille Goarant ^{*}, France Régnier, Raphaël Brizard,
Anne-Laure Marteau

Laboratoire de Recherche Aquacole IFREMER en Nouvelle-Calédonie, Station d'Aquaculture de Saint
Vincent, BP 2059, 98845 Nouméa Cedex, New Caledonia

Accepted 18 August 1998

Abstract

Vibriosis is a major disease problem in shrimp aquaculture, affecting all developmental stages, from larvae in hatchery tanks to juveniles and broodstock in growout ponds. However, bacterial strains responsible for vibriosis in the successive stages are usually considered to be different, and virulence specificity has been reported both at the species and at the stage levels. The so-called « Syndrome 93 » is a seasonal juvenile vibriosis caused by *Vibrio penaeicida* which affects *Penaeus stylirostris* in growout ponds and broodstock tanks in New Caledonia. This pathology does not cause any mortality in hatchery or nursery phases. An experimental infection design using balneation of postlarvae and early juveniles in *V. penaeicida* suspensions was used to evaluate the developmental stage at which shrimp become sensitive to this vibriosis. We demonstrated that the acquisition of susceptibility to this pathogen is very sudden and correlated with the acquisition of the definitive rostral formula, and from this draw conclusions regarding virulence mechanisms of *V. penaeicida* in *P. stylirostris*. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Penaeus stylirostris*; *Vibrio* sp.; Diseases and their control—crustaceans

1. Introduction

Vibriosis is a major disease problem in shrimp aquaculture, causing high mortalities and severe economic losses in all producing countries (Brock and LeaMaster, 1992; Lightner, 1988; Mohny et al., 1994). It is most often considered as an opportunistic

^{*} Corresponding author. Tel.: +33-687-28-51-71; Fax: +33-687-28-78-57; E-mail: goarant@ifremer.nc

Article 2 : Épidémiologie moléculaire des *Vibrio* associés au Syndrome 93 affectant les crevettes en élevage

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 1999, p. 1145-1151
0099-2240/99/504-00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 65, No. 3

Arbitrarily Primed PCR To Type *Vibrio* spp. Pathogenic for Shrimp

CYRILLE GOARANT,¹ FABRICE MERIEN,² FRANCK BERTHE,³ ISABELLE MERMOUD,⁴
AND PHILIPPE PEROLAT^{2*}

Laboratoire de Recherche Aquacole IFREMER en Nouvelle-Calédonie, Station d'Aquaculture de Sabu Vincent, 98846 Nouméa Cedex,¹ and Laboratoire des Leptospires, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie,² and CIRAD/EMVT, Programme Elevage,⁴ 98845 Nouméa Cedex, New Caledonia, and Laboratoire Biologie et Ecologie des Invertébrés Marins, IFREMER Station de La Tremblade, Ronce les Bains, 17390 La Tremblade, France³

Received 9 February 1998/Accepted 4 January 1999

A molecular typing study on *Vibrio* strains implicated in shrimp disease outbreaks in New Caledonia and Japan was conducted by using AP-PCR (arbitrarily primed PCR). It allowed rapid identification of isolates at the genospecies level and studies of infraspecific population structures of epidemiological interest. Clusters identified within the species *Vibrio parahaemolyticus* were related to their area of origin, allowing discrimination between Japanese and New Caledonian isolates, as well as between those from two different bays in New Caledonia separated by only 50 km. Other subclusters of New Caledonian *V. parahaemolyticus* isolates could be identified, but it was not possible to link those differences to accurate epidemiological features. This contribution of AP-PCR to the study of vibriosis in penaeid shrimps demonstrates its high discriminating power and the relevance of the epidemiological information provided. This approach would contribute to better knowledge of the ecology of *Vibrio* spp. and their implication in shrimp disease in aquaculture.

Vibriosis is a major disease problem in shrimp aquaculture, causing high mortality and severe economic loss in all producing countries (5, 17, 21). *Vibrio* spp. are most often considered opportunistic pathogens in shrimp, but primary disease caused by highly virulent strains has also been reported (9, 13, 27). On the basis of phenotypic data, the major species causing vibriosis in shrimp are *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus* (14, 17, 18).

In New Caledonia (South Pacific), shrimp aquaculture is based on the complete cycle of *Penaeus stylirostris* in a semi-intensive farming system in earthen ponds. Located between latitudes 19°S and 23°S, New Caledonia has a tropical oceanic climate with a hot season from mid-November to mid-April. The average minimum and maximum morning water temperatures in shrimp ponds are 20.5°C in July and 28.2°C in February. Since 1993, shrimp farms have been affected by a disease, named syndrome 93, causing mass mortality with a significant decrease in yields and survival rates. Mortality episodes frequently occur during the southern winter, from mid-May to mid-September. Moribund prawns display a wide spectrum of clinical signs, including disoriented swimming, lethargy, weakness, and abnormal coloration of the body and appendages. High numbers of bacteria belonging to the genus *Vibrio* are systematically isolated from diseased shrimp hemolymph, revealing bacterial septicemia (20). Based on phenotypic and genotypic studies (ribotyping and DNA-DNA hybridization) (6), the species involved in syndrome 93 belong to the genospecies *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo*, and *V. parahaemolyticus*. Since 1994, *V. parahaemolyticus* and *V. nigripulchritudo* were the most frequently isolated, and their high pathogenicity was demonstrated in an *in vivo* experimental infection system in *P. stylirostris* (11).

Phenotype-based identification of marine bacteria relies on

time-consuming techniques that have limited discriminating power (1, 2). The current genomic approaches used for the identification and the typing of *Vibrio* strains, such as DNA-DNA hybridization and ribotyping (1, 13, 23), are useful for taxonomic studies and identification to the subspecies level. However, reliable tools for strain differentiation are essential for studying epidemiology and pathogenicity. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) generates fingerprints that can be used to compare microorganisms at the species level and within a species with high discriminating power (30, 31). This method, which has successfully been applied to numerous bacterial species and strains (19, 24, 25, 32), is very reliable, does not require any previous knowledge of DNA sequences in the genome to be analyzed, and needs much less DNA than current molecular genotyping methods. The purpose of this study was to characterize and differentiate the *Vibrio* isolates involved in syndrome 93 by using fingerprints obtained with AP-PCR with regard to their geographic origins and the zootechnical practices used at the corresponding shrimp farms.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Both reference strains and wild-type isolates were cultured in accordance with standard procedures (1).

(I) **Reference strains.** Four type strains, from the Collection of the Pasteur Institute (Paris, France), representing the major species previously identified in syndrome 93 mortality outbreaks were included in this study (Table 1): *V. parahaemolyticus* KH-1^T (which was isolated from *Penaeus japonicus* in Japan), *V. alginolyticus* CIP 103336^T (= ATCC 17749), *V. harveyi* CIP 103102^T (= ATCC 14126), and *V. nigripulchritudo* CIP 103192^T (= ATCC 27043).

(II) **Wild-type isolates.** Fifty-three field isolates from New Caledonia were selected as representative of the strains involved in outbreaks of vibriosis (syndrome 93) from January 1994 to June 1995 (Table 1). Forty-five were isolated from diseased shrimp during three mortality peaks that occurred between March and June 1995 in four different shrimp farms (Fig. 1). The eight remaining strains are representative of previous outbreaks. In order to compare pathogenic *V. parahaemolyticus* isolates from New Caledonia with others field strains, three Japanese *V. parahaemolyticus* strains (KO-1, KT-1, and PD-A) isolated from diseased *P. japonicus* shrimp were included in the studied set. New Caledonian field strains were isolated from hemolymph of diseased shrimp with vibriosis as the only or major morphotype. A single strain was conserved for each individual shrimp. All of the strains were isolated on Marine Agar 2216E (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), except strain F14 (TCBS Agar, Difco). Identification to the species level

* Corresponding author. Present address: Institut Pasteur, BP 61, 98845 Nouméa, New Caledonia. Phone: 687 27 02 80. Fax: 687 27 33 90. E-mail: perolat.pasteur@canl.nc.

Article 3 : Une voie d'entrée possible du *Vibrio* dans la crevette : la pénétration trans-cuticulaire



Aquaculture 183 (2000) 25–30

Aquaculture

www.elsevier.nl/locate/aqua-online

A white spot disease-like syndrome in the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) as a form of bacterial shell disease

Cyrille Goarant ^{*}, Raphaël Brizard, Anne-Laure Marteau

Laboratoire de Recherche Aquacole IFREMER en Nouvelle-Calédonie, Station d'Aquaculture de Saint Vincent, BP 2059, 98845 Nouméa Cedex, New Caledonia

Accepted 7 August 1999

Abstract

In May 1997, some white lesions evoking the white spot syndrome disease were observed in *Litopenaeus stylirostris* broodstock in New Caledonia. The occurrence of these lesions was neither associated with mortality, nor with histological evidence of white spot syndrome baculovirus (WSBV). The evidence suggests that these lesions result from a form of bacterial disease and are associated with an increased bacterial flora on the outer surface of the cuticle, as well as an increased incidence throughout the molt cycle. A microscopic observation of these lesions allows them to be differentiated from WSBV-associated lesions. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Litopenaeus stylirostris*; Diseases and their control — crustaceans

1. Introduction

There have been a number of cases reporting the presence of white spot lesions on shrimp shells (AQUACOP, 1984; Lee et al., 1996; Limsuwan, 1997). Most of these cases were associated with mortalities caused by viruses of the white spot syndrome baculovirus complex (Takahashi et al., 1994; Chou et al., 1995; Wang et al., 1995), which cause severe losses in shrimp farms, the major gross sign in diseased shrimp

^{*} Corresponding author. Tel.: +687-28-51-71; fax: +687-28-78-57; e-mail: cgoarant@ifremer.fr

Article 4 : Exotoxines des *Vibrio* responsables du Syndrome 93 chez les crevettes en élevage

Vol. 40: 101-107, 2000

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published March 14

Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp

Cyrille Goarant^{1,*}, José Herlin¹, Raphaël Brizard¹, Anne-Laure Marteau¹,
Claude Martin², Bernard Martin²

¹Laboratoire de Recherche Aquacole IFREMER en Nouvelle-Calédonie, Station d'Aquaculture de Saint Vincent, BP 2059,
98845 Nouméa Cedex, New Caledonia

²Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université Française du Pacifique, Centre Universitaire de Polynésie Française,
BP 6570, FAA'A Aéroport, Tahiti, French Polynesia

ABSTRACT: Vibriosis is a major disease problem in shrimp aquaculture. 'Syndrome 93' is a seasonal juvenile vibriosis caused by *Vibrio penaeicida* which affects *Litopenaeus stylirostris* in grow-out ponds in New Caledonia. This study assessed the toxic activities of extracellular products (ECPs) from *V. penaeicida*, *V. alginolyticus* and *V. nigripulchritudo* using *in vivo* injections in healthy juvenile *L. stylirostris* (= *Penaeus stylirostris*) and *in vitro* assays on shrimp primary cell cultures and the fish cell line epithelioma papulosum cyprini (EPC). Toxic effects of ECPs were demonstrated for all pathogenic *Vibrio* strains tested both *in vivo* and *in vitro*, but for shrimp only, no effect was observed on the fish cell line. ECP toxicity for New Caledonian *V. penaeicida* was found only after cultivation at low temperature (20°C) and not at higher temperature (30°C). This points to the fact that 'Syndrome 93' episodes are triggered by temperature drops. The assays used here demonstrate the usefulness of primary shrimp cell cultures to study virulence mechanisms of shrimp pathogenic bacteria.

KEY WORDS: *Vibrio* · *Vibrio penaeicida* · Shrimp · Extracellular products · Temperature

INTRODUCTION

Vibriosis is a major disease problem in shrimp aquaculture (Lightner 1988, Brock & LeaMaster 1992, Mohny et al. 1994). 'Syndrome 93' is a seasonal vibriosis caused by *Vibrio penaeicida* which affects juvenile *Litopenaeus stylirostris* (= *Penaeus stylirostris*) in grow-out ponds in New Caledonia. Little is known about virulence factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp, despite extensive studies on other *Vibrio* species, including species pathogenic to humans and some species pathogenic to fish or shellfish (Brown & Roland 1984, Nottage & Birkbeck 1986, 1987, Fouz et al. 1994, Pedersen et al. 1997). As exotoxins often play a major role in the pathogenesis of bacterial diseases (Finlay & Falkow 1997), this study was aimed at assessing the toxic activities of extracellular products (ECPs) of *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo* strains pathogenic to shrimp, using *in vivo* injections

in healthy juvenile *L. stylirostris*, and *in vitro* assays on shrimp primary cell cultures and the fish cell line epithelioma papulosum cyprini (EPC).

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, culture conditions and preparation of toxic extracts. *Vibrio alginolyticus* strain SF 5, *V. penaeicida* strain AM 101 and *V. nigripulchritudo* strain AM 102 (Costa et al. 1998) were used in this study. Each strain was cultured in brain heart infusion (Bio Mérieux, France) because this rich medium has been shown to promote the expression of exotoxins in some *Vibrio* strains (Nishibuchi & Seidler 1983). Salinity of the culture medium was adjusted to 25 ppt by the addition of artificial seawater salt (Instant Ocean®). Cultures were carried out in 8 ml of medium placed in sloped 25 ml screw-capped culture tubes for 48 h at different temperatures (usually 25°C, see below) under continuous shaking (preliminary trials showed that 2 d old cultures had the most toxic supernatant fluids). The

*E-mail: cgoarant@ifremer.fr

II.B. Principales contributions au Défi Santé *stylirostris*

Article 5 : Description générale du Syndrome d'été et identification de l'agent étiologique



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Aquaculture 253 (2006) 105–113

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

“Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*

Cyrille Goarant*, Dominique Ansquer, José Herlin, David Domalain,
Frédéric Imbert, Sophie De Decker

IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa cedex, New Caledonia

Received 3 May 2005; received in revised form 5 July 2005; accepted 25 July 2005

Abstract

The Summer Syndrome is a new shrimp disease that has been affecting a shrimp growout farm in New Caledonia since end of 1997. It was recognized to be caused by a systemic vibriosis due to *Vibrio nigripulchritudo*. This new disease turned out almost immediately enzootic in the shrimp farm involved and has affected all its crops ever since. Since the year 2000, *V. nigripulchritudo* strains have been found in several shrimp farms, although Summer Syndrome is still limited to one particular area, affecting, since 2003, two adjoining farms. As part of a multidisciplinary research program, a high-frequency survey was carried out during the summer 2002–2003 in two shrimp farms: one affected farm and another one in which pathogenic strains could be isolated but without any disease event. It permitted a good description of *V. nigripulchritudo* dynamics in shrimp and the ecosystem in both farms. The study of virulence characteristics of some isolates showed that pathogenic and non-pathogenic strains occur in the shrimp farms environment and that both may be found at the same time in one farm. Our results strongly suggest a persistence of pathogenic strains in wet zones of the pond sediment at low concentrations between crops in the affected farm, and their development during the rearing cycle as a cause of shrimp infection.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Shrimp; Diseases and their control; Vibrio; Epidemiology

1. Introduction

Vibriosis is a major disease problem in almost all farmed marine animals, including penaeid shrimp

(Lightner and Lewis, 1975; Takahashi et al., 1985; Lightner, 1988; Brock and LeaMaster, 1992; Mohny and Lightner, 1994). However, it has only received poor research attention so very poor knowledge has been gained on this pathology. This is due, in part, to the authority given to treat with antibiotics in many producing countries. Nevertheless, the massive use of

* Corresponding author. Tel.: +687 28 51 71; fax: +687 28 78 57.
E-mail address: Cyrille.Goarant@ifremer.fr (C. Goarant).

Article 6 : Épidémiologie moléculaire et pathologie expérimentale du syndrome d'été : une souche hautement pathogène mise en évidence



Available online at www.sciencedirect.com



Systematic and Applied Microbiology 29 (2006) 570–580

SYSTEMATIC AND
APPLIED MICROBIOLOGY

www.elsevier.de/syapm

Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia

Cyrille Goarant^{a,*}, Yann Reynaud^{a,b}, Dominique Ansquer^a, Sophie de Decker^a, Denis Saulnier^b, Frédérique le Roux^b

^aIFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa cedex, Nouvelle-Calédonie

^bIFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie BP 133, 17390 La Tremblade, France

Received 28 November 2005

Abstract

A collection of 57 isolates of *Vibrio nigripulchritudo* from either diseased or healthy shrimp and from shrimp farms environment was studied in order to gain a better understanding of the epidemiology of this pathogen, notably isolated from two distinct shrimp disease complexes. Molecular typing using two different techniques, arbitrarily primed PCR (AP-PCR) and multi-locus sequence typing (MLST), studied together with experimental pathology data allowed a relevant epidemiological insight into this possibly emerging pathogen. Additionally, results obtained with the two molecular typing techniques were congruent and allowed discriminating the strains associated with the "Summer Syndrome" from strains isolated from other contexts, especially the other shrimp vibriosis "Syndrome 93". These results highlight that the "Summer Syndrome" is most probably caused by an emergent clonal pathogen that therefore deserves surveillance and that AP-PCR can satisfactorily be used for that purpose.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Vibriosis; Mariculture; AP-PCR; MLST; Typing; Epidemiology; Virulence

Introduction

Shrimp aquaculture has been constantly increasing over the last decades, providing now half of the world shrimp supplies [30]. However, this rapid increase in culture has often been impeded by very severe epizootics [19,34]. Worldwide, viruses are major problems, being responsible for the most spectacular losses among shrimp [23,33]. However, vibriosis is also an important disease among penaeid shrimp [3,21,22,26,36], but this has yet only received little research attention. Therefore, limited knowledge has been gained on these pathologies

and little is known concerning the epidemiology of *Vibrio* spp that are pathogenic to farmed shrimp.

New Caledonia (a 450 × 50 km wide island in the South Pacific between 19°S and 23°S) is a small producer regarding world global trade. However, this industry has gained considerable economic importance in the last three decades, now representing the second major export sector of the country. Actually, the shrimp farming industry has major advantages, namely a tropical oceanic climate, a domesticated *Litopenaeus stylirostris* line reared in closed cycle for almost 25 years, an almost virus-free status, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) being the only known virus present and the domestic stock of *L. stylirostris* being resistant to it [40]. Yet this industry

*Corresponding author. Tel.: +687 28 51 71; fax: +687 28 78 57.
E-mail address: Cyrille.Goarant@ifremer.fr (C. Goarant).



Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry

Cyrille Goarant^a, Fabrice Merien^{b,*}

^a IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie

^b Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP 61, 98845 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie

Received 13 June 2005; received in revised form 22 February 2006; accepted 23 February 2006

Available online 17 April 2006

Abstract

Shrimp farming is a small but growing industry in New Caledonia. Since 1993, "Syndrome 93" has been affecting New Caledonian shrimp farming industry every cold season, causing severe epizootic mortalities in grow-out ponds and significant losses. Highly pathogenic strains of *Vibrio penaeicida* are considered the etiological agent of the disease in *Litopenaeus stylirostris*. On one hand, studies demonstrated that healthy shrimp may carry *V. penaeicida* for weeks with a high overall prevalence, regardless of any seasonal pattern or temperature conditions. On the other hand, larvae are free of *V. penaeicida* and are also resistant to experimental infection. *V. penaeicida* is frequently detected in incoming water pumped from the bays, which was shown, by a molecular typing study, to be the infectious source. This particular epidemiological pattern highlights the major role of the factors that trigger and aggravate the disease in grow-out ponds, where shrimp populations carry the pathogen all year round. In order to gain a better understanding of "Syndrome 93" epidemiology, quantification of *V. penaeicida* both in shrimp and the shrimp farm ecosystem is necessary. This article describes the steps in the successful development of a real-time PCR quantification assay of *V. penaeicida* in shrimp haemolymph, seawater (from ponds or bays) and sediment pore water, including the choice of an accurate extraction technique. The entire detection method, including sample processing, DNA extraction and real-time PCR amplification, can be completed within 4 h.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Extraction techniques; Mariculture; Quantification; Real-time PCR; *Vibrio*; Vibriosis

1. Introduction

Vibrio species are widely distributed in mariculture facilities throughout the world. Vibriosis is a major disease problem in almost all farmed marine animals, including penaeid shrimp (Lightner and Lewis, 1975; Takahashi et al., 1985; Lightner, 1988; Brock and

LeaMaster, 1992; Mohny and Lightner, 1994). Our knowledge of the physiopathology of vibriosis in shrimp remains very limited. Indeed, very little knowledge has been gained on this pathology and little is known concerning virulence factors in *Vibrio* spp. that are pathogenic to farmed marine invertebrates. As an alternative to conventional zootechnical practices, sanitation measures could be conceivable to minimize the introduction of pathogenic *Vibrio* in a non-infected shrimp rearing ecosystem. Still, to meet this objective a

* Corresponding author.

E-mail address: fmerien@pasteur.nc (F. Merien).

Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia

Cyrille Goarant^{a,b,*}, Yann Reynaud^{b,c}, Dominique Ansquer^b, Sophie de Decker^b, Fabrice Merien^a

^a Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, Nouméa, New Caledonia

^b IPREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia

^c IFREMER, Département Génétique et Pathologie, La Trinité, France

Received 17 January 2007; received in revised form 16 March 2007; accepted 20 March 2007
Available online 30 March 2007

Abstract

In a previous study, we demonstrated the existence of an emerging cluster of *Vibrio nigripulchritudo* that proved to be associated with shrimp mortality events in New Caledonia. Using sequence polymorphisms evidenced in this previous MultiLocus Sequence Typing study, we developed two new quantitative PCR assays permitting the detection and quantification of *V. nigripulchritudo* at the genospecies level using SYBR Green I chemistry and at the emerging cluster level using Fluorescence Resonance Energy Transfer technology with hybridization probes.

The use of this molecular diagnostic tool evidenced the colonization of the shrimp pond ecosystem by the pathogenic cluster at least at the onset of the disease. This new tool will allow better investigation of the dynamics of this bacterial pathogen in the shrimp farm ecosystem.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Real-time PCR; Mariculture; Pathogen; *Vibrio*; Cluster-specific; Shrimp

1. Introduction

Vibrio species are widely distributed bacteria that colonize aquatic habitats, and are notably present in and around mariculture facilities. Vibriosis, diseases caused by *Vibrio* species, are known to be major disease problems in farmed marine animals, including penaeid shrimp, in which they have been recognized as potential pathogens since the beginning of shrimp farming activities (Lightner and Lewis, 1975; Bondad-Reantaso et al., 2005). However, diagnostic tools allowing to study vibriosis in shrimp have seldom been developed. Conventional laboratory methods based on bacterial culture and isolation from the shrimp or its environment demand the use of suitable culture media and subsequent identification. Moreover, they are time-consuming and require several days to obtain confirmatory results. Additionally, the concept of “infective dose” is of parti-

cular concern in *Vibrio* infections (Lobitz et al., 2000), and was notably confirmed in shrimp vibriosis (Saulnier et al., 2000). Therefore, the development of reliable, quantitative and sensitive methods for the detection of bacterial shrimp pathogens is essential both for research studies or to conceive and control sanitization practices.

Conventional polymerase chain reaction (PCR) method had the potential to make a dramatic impact in diagnosing infectious diseases. More recently, the use of real-time PCR has made the detection and quantification of bacteria much more rapid and was successfully applied to a number of *Vibrio* species (Blackstone et al., 2003; Panicker et al., 2004) including shrimp pathogens (Goarant and Mérien, 2006).

Additionally, it is recognized that strains belonging to the same *Vibrio* species can have different virulence patterns to shrimp (Oakey and Owens, 2000; Hernandez and Olmos, 2004; Goarant et al., 2006a). However the knowledge of the pathophysiology of vibriosis in shrimp remains limited and little is known concerning virulence factors in *Vibrio* that are pathogenic to shrimp. As a consequence, there is frequently a lack of genomic data that would

* Corresponding author. Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, BP 61, 98845 Nouméa cedex, New Caledonia.
E-mail address: cgoarant@ifremer.fr (C. Goarant).

Article 9 : Un plasmide corrélé à la virulence chez les souches de *V. nigripulchritudo* du Syndrome d'été

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2008, p. 3038–3047
0099-2240/08/008.00+0 doi:10.1128/AEM.02680-07
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 74, No. 10

Correlation between Detection of a Plasmid and High-Level Virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a Pathogen of the Shrimp *Litopenaeus stylirostris*[†]

Yann Reynaud,^{1,2} Denis Saulnier,¹ Didier Mazel,³ Cyrille Goarant,^{2†} and Frédérique Le Roux^{1,3*}

Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, 17390 La Tremblade, France¹; Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, Ifremer, BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie²; and Unité Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA 2171, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724, Paris, France³

Received 27 November 2007/Accepted 2 March 2008

Vibrio nigripulchritudo, the etiological agent of *Litopenaeus stylirostris* summer syndrome, is responsible for mass mortalities of shrimp in New Caledonia. Epidemiological studies led to the suggestion that this disease is caused by an emergent group of pathogenic strains. Genomic subtractive hybridization was carried out between two isolates exhibiting low and high virulence. Our subtraction library was constituted of 521 specific fragments; 55 of these were detected in all virulent isolates from our collection ($n = 32$), and 13 were detected only in the isolates demonstrating the highest pathogenicity ($n = 19$), suggesting that they could be used as genetic markers for high virulence capacity. Interestingly, 10 of these markers are carried by a replicon of 11.2 kbp that contains sequences highly similar to those of a plasmid detected in *Vibrio shilonii*, a coral pathogen. The detection of this plasmid was correlated with the highest pathogenicity status of the isolates from our collection. The origin and consequence of this plasmid acquisition are discussed.

Vibrioses are important diseases threatening the sustainable development of the penaeid shrimp aquaculture industry (6, 7, 20, 21). However, little research attention has been paid to these diseases, mostly because viruses are considered the most significant diseases in crustacean aquaculture (22). As a result, solutions to control vibriosis remain scarce. The massive use of antibiotics is certainly not a sustainable control strategy, since it favors the emergence of antibiotic-resistant strains (17). Moreover, antibiotics are often banned from aquaculture ponds for commercial reasons and because of the increasing concern about residue issues. Additionally, vaccination is not possible in invertebrates, limiting the ways to reduce disease impact in shrimp culture (2). Therefore, there is a need to understand the environmental, physiological, and bacterial conditions leading to the expression of the disease in order to determine ecological or zootechnical methods that could in the end control these diseases (16). One step consists of diagnosing and quantifying the etiologic agent of the disease, both in the cultivated animal and in its environment.

It is recognized that strains belonging to the same *Vibrio* species can have different virulence patterns ranging from highly pathogenic (HP) strains to nonvirulent ones (8, 13, 19). Therefore, the diagnosis often needs to be infraspecific, i.e., based on epidemiologically relevant sequence polymorphisms that can be regarded as genetic markers of virulence (9, 25).

Suppressive subtractive hybridization (SSH) has been successfully and extensively used in a wide range of bacterial

species to identify strain-specific genes (14, 32, 33). In comparisons of virulent and nonvirulent strains, the different genes evidenced may encode virulence factors. Moreover, identifying these strain-specific regions can help to bring to light the traces of horizontal gene transfers, which are known to provide selective advantages and to be implicated in the emergence of new pathogens (4, 10, 24).

In New Caledonia (South Pacific; 19°S, 23°W), a disease called “summer syndrome” has occurred seasonally in penaeid shrimp farms since 1997 and causes severe epizootic mortality. A multidisciplinary research program aiming at a global understanding of this disease was set up, bringing together rearing technology, pond ecosystem studies, shrimp physiology and immunology, nutrition and genetics, pathology, and bacteriology approaches (11). Epidemiological studies have revealed that this disease is a vibriosis due to HP *Vibrio nigripulchritudo* isolates (7, 8). To the best of our knowledge, this is the first reported disease associated with this *Vibrio* species. Because the New Caledonian shrimp production is also affected by another vibriosis, namely, syndrome 93, occurring during the cool season (6), the spreading of the summer syndrome to other shrimp farms would undoubtedly threaten the sustainable development of the New Caledonian shrimp industry. Preliminary studies based on a collection of *V. nigripulchritudo* isolates have brought to light different virulence levels, according to experimental-infection results (7). The genetic structures of 58 selected *V. nigripulchritudo* isolates were studied using arbitrarily primed PCR (AP-PCR) and multilocus sequence typing (MLST) (8). These two typing methods gave congruent results, revealing a clustering of HP and moderately pathogenic isolates (MP). None of the nonpathogenic (NP) isolates was present in this cluster. The hypothesis that this particular cluster of pathogenic *V. nigripulchritudo* isolates emerged within a shrimp farm environment has been pro-

* Corresponding author. Mailing address: Unité Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA 2171, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris, France. Phone: 33 1 40 61 32 87. Fax: 33 1 45 68 88 34. E-mail: fleroux@pasteur.fr.

† Present address: LRB, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, BP 61, 98845 Nouméa Cedex, New Caledonia.

[‡] Published ahead of print on 21 March 2008.

Article 10 : Application des outils moléculaires au suivi des *Vibrio* pathogènes dans le milieu

ORIGINAL ARTICLE

***Vibrio nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediments**

E. Walling¹, E. Vourey¹, D. Ansquer¹, B. Beliaeff¹ and C. Goarant²

¹ IFREMER, Station d'Aquaculture de Saint-Vincent, Noumea Cedex, New Caledonia

² Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Noumea, New Caledonia

Keywords

detection, diagnosis, diseases, ecology, PCR, plasmids, soil, virulence.

Correspondence

Cyrille Goarant, Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP 61, 98845 Noumea cedex, New Caledonia. E-mail: cgoarant@pasteur.nc

2009/0167: received 27 January 2009, revised 30 June 2009 and accepted 14 October 2009

doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04601.x

Abstract

Aims: A description of bacterial pathogens in shrimp ponds is necessary to understand their pathogenesis. *Vibrio nigripulchritudo* was shown to contain saprophytic and pathogenic strains among New Caledonian isolates. We established a method to map the development of *V. nigripulchritudo* in pond sediments at three different genetic levels: the species level, then at the pathogenic cluster level and finally at the plasmid level, present only in all highly pathogenic isolates.

Methods and Results: PCR methods were applied to shrimp pond sediments both before and after a mortality outbreak. Using crude samples, the species *V. nigripulchritudo* is not detected at first (0/42 samples at day 56 post stocking) but appears frequently in the sediments after the mortality event (30/42 at day 107). The distribution of strains from the pathogenic cluster of *V. nigripulchritudo* also follows this pattern. In contrast, the pSFn1 virulence-associated plasmid was detected in one sample at day 56 and none at day 107. An enrichment method was developed to lower the detection limits of our assays. After enrichment, the species *V. nigripulchritudo* was detected in all samples at both dates. The number of samples positive for pSFn1 was 42/42 samples at day 56 and 29/42 at day 107.

Conclusions: These results show that the sediments contain *V. nigripulchritudo*, notably pathogenic strains. Surprisingly, the virulence-associated plasmid pSFn1 found in all *V. nigripulchritudo* isolated from moribund shrimp appears less frequently in sediments, possibly being useless or even detrimental to its recipient bacteria in this environment.

Significance and Impact of the Study: This study confirms the presence of pathogenic *V. nigripulchritudo* strains in shrimp pond sediment before a mortality outbreak complying with a previous hypothesis that sediments could be the infecting reservoir. After the outbreak, both total *V. nigripulchritudo* and pathogenic strains populations have largely increased, possibly contributing to the recurrent mortality observed in this shrimp vibriosis.

Introduction

In New Caledonia, located in the South Pacific Ocean, shrimp pond farming is based on the culture of the domesticated Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Since 1980, production has increased from nonexistent to a total of about 2000 tonnes per year (*Institut de la statis-*

tique et des études économiques, <http://www.isee.nc>). Although the production is small compared to the world shrimp production (2.6 million tonnes for penaeid shrimp, <http://www.ifremer.fr/aquaculture>), in New Caledonia, this industry is the second export business on the island. However, shrimp aquaculture in New Caledonia can be threatened by disease outbreaks.



Influence of sediment characteristics on shrimp physiology: pH as principal effect

Hugues Lemonnier^{a,*}, Eric Bernard^b, Eric Boglio^a,
Cyrille Goarant^a, Jean-Claude Cochard^b

^aLaboratoire d'Aquaculture de Calédonie, IFREMER, BP 2059, 98846 Nouméa, Nouvelle Calédonie, France

^bAquacop, Centre Océanologique du Pacifique, IFREMER, BP 7004, Taravao, Tahiti, Polynésie Française, France

Received 5 February 2004; received in revised form 29 June 2004; accepted 1 July 2004

Abstract

Penaeid shrimp reared in earthen ponds are exposed to sediment, which can, in some instances, induce a stress. In seawater, the osmoregulatory capacity (hyporegulation) is a useful tool to compare the physiological condition of shrimp exposed to various stressors. By keeping some shrimp in cages at different locations of a single pond heterogeneous in terms of sediment quality, it was possible, using osmotic pressure (OP), to identify some locations where the stress was maximum and some others where it was minimum. Simultaneously, sediment samples were taken and analysed in order to evaluate some physico-chemical parameters that could be related to the stress observed in the shrimps kept in the cages. This approach allowed to show a significant positive correlation between the pH of the sediment surface and the shrimp osmotic pressure. This result was confirmed in a study carried out in experimental 70-l tanks, where osmotic pressure decreased significantly as water pH decreased from 7.0 to 6.5. The methodology developed in this study may be useful to evaluate the stress caused by sediment in shrimp farms.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Shrimp physiology; Osmotic pressure; Stress; Sediments; pH

* Corresponding author. Tel.: +687 28 51 71; fax: +687 28 78 57.

E-mail address: hlemonni@ifremer.fr (H. Lemonnier).

Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage

Chantal Mugnier*, Etienne Zipper, Cyrille Goarant, Hugues Lemonnier

Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, IFREMER, BP2059, 98846 Nouméa Cedex, New Caledonia

Received 14 October 2006; received in revised form 20 November 2007; accepted 20 November 2007

Abstract

The effect of ambient ammonia, hypoxia and combination of both on survival and the physiological and immunological response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* in relation to molt stage was studied. Shrimp were submitted to 44.0–71.5 mg l⁻¹ total ammonia-N corresponding to 2.0 mg l⁻¹ unionized ammonia NH₃-N and/or to 1.5 mg O₂ l⁻¹ (4.3 kPa) for 24 hours. Survival was recorded and the molt stages of both dead and surviving shrimp determined. Only shrimp in intermolt and premolt stages were sampled for analysis of haemolymph. Haemolymph was assayed for osmoregulatory capacity (OC), magnesium ion (Mg²⁺), calcium ion (Ca²⁺), total proteins, oxyhaemocyanin, lactate, glucose and total haemocyte count (THC).

Low mortalities were recorded for shrimp submitted independently to ammonia or hypoxia. Seventy five percent of dead shrimp were in early post molt (stage A) in ammonia treatment, while hypoxia affected mainly late premolt animals (stage D₂). A synergic effect of ammonia and hypoxia combination (A+O₂ treatment) on mortality was observed, affecting nearly exclusively shrimp in late premolt stage D₂.

Analysis of molt stage repartition at the end of the experiment suggests that ammonia treatment may have accelerated molting.

The common physiological response of shrimp to the different treatments was characterized by a reduced OC and an increase in Ca²⁺. Increase in Mg²⁺ could not be validated by the statistical analysis, as well as glycaemia variations. Plasmatic lactate level increased and THC decreased in shrimp submitted to hypoxia and the combination of hypoxia and ammonia. Total proteins concentration was reduced in ammonia and A+O₂ treatments. The effect was more pronounced in late premolt shrimp than in intermolt shrimp. Combination of ammonia and hypoxia led to a physiological response stronger than this observed for ammonia-alone and/or hypoxia-alone treatments, except for oxyhaemocyanin.

The effects of each external factor (ammonia, hypoxia) and the combination of both, and internal one (molt stage) are discussed.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ammonia; Haemolymph constituents; Hypoxia; *Litopenaeus stylirostris*; Molt stage; Penaeid shrimp; Stress; Survival

1. Introduction

Farming of shrimp in semi-intensive culture system may be subjected to environmental variations such as fluctuations of dissolved oxygen, temperature, or accumulation of potentially toxic compounds like ammonia or nitrite (Chien, 1992). Variations of environmental factors are not necessarily independent of each other, and combination of several factors which may be stressful for shrimp could be encountered at the same time in a

pond. A consequence of shrimp being stressed may be a decrease in immune defence and an increased susceptibility to pathogens (Le Moullec and Haffner, 2000; Horowitz and Horowitz, 2001).

L. stylirostris is the only species cultivated in New Caledonia. It is the second exported product of the country, but its culture is still a developing industry. Those shrimp benefit an almost virus-free status but are commonly exposed to seasonal mortalities due to vibriosis either during the cold or the warm seasons (Costa et al., 1998; Goarant et al., 2006). Variations in environmental factors seem to have an impact on the mortalities observed (Mermoud et al., 1998).

* Corresponding author. Tel.: +687 35 25 71; fax: +687 28 78 57.

E-mail address: cmugnier@ifremer.fr (C. Mugnier).

Articles 13 et 14 : La sélection génétique comme une des approches les plus prometteuses pour contrer les vibrioses des crevettes en élevage

Aquaculture 278 (2008) 43–50



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online



Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*

Emmanuel Goyard ^{a,*}, Cyrille Goarant ^a, Dominique Ansquer ^a, Pierre Brun ^a, Sophie de Decker ^a, Robert Dufour ^a, Christian Galinié ^b, Jean-Marie Peignon ^a, Dominique Pham ^a, Elodie Vourey ^b, Yves Harache ^a, Jacques Patrois ^a

^a Ifremer, Département Aquaculture en Calédonie, Station de Saint Vincent, BP 2059, 98846 Nouméa, New Caledonia

^b Groupement des Fermes Aquacoles, Chambre d'Agriculture, BP 111, 98 845 Nouméa, New Caledonia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2007

Received in revised form 6 March 2008

Accepted 12 March 2008

Keywords:

Genetic improvement

Cross breeding

Shrimp

Penaeus (Litopenaeus) stylirostris

Growth

Survival

Vibriosis

ABSTRACT

Two populations of the Latin American shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* domesticated in Hawaii and in New Caledonia were previously shown to be genetically differentiated and proven highly inbred. In New Caledonia, where different vibriosis affect shrimp production and antibiotic use is banned in growing ponds, the Hawaiian population was introduced to increase the allelic variability available for local shrimp farmers and start a genetic improvement program. Growth and survival rates of the two pure populations and the two-way F₁-hybrids obtained by breeding Hawaiian animals with New Caledonian animals were assessed in several simple experiments (earthen ponds, floating cages and experimental infection challenges) during two years on two successive generations. Results were very consistent: F₁-hybrids growth rates in earthen ponds were 39% (±7% SD) higher than for pure populations. Cage experiments demonstrated no competition between the different populations when reared together or separately in a common environment. The F₁-hybrids also showed better survival rates in all experiments. Combining the results on growth and survival rates leads to the conclusion that biomass production is much higher with F₁-hybrid populations than with pure populations using the same quantity of juveniles stocked: biomass production in ponds was increased 1.4 and 2.3 times on year 1 and year 2 respectively, and 1.9 times in floating cages. The advantage of growing F₁-hybrids appeared proportionally higher when environmental and sanitary conditions led to poorer survival (34% in year 2 vs. 56% in year 1).

These results are a good example of performance improvement by heterosis effect and/or of performance loss due to inbreeding in the pure populations. This study demonstrates that aquaculture industries which cannot afford large selection programs may benefit from using two different inbred parental stocks to produce F₁-hybrids for each commercial growout. This is notably true when only inbred populations are available, or when introduction of genetic variability from the wild or from other genetic resources represents a zoo-sanitary risk. In our case, the expected increase in *L. stylirostris* production could be around 85% (according to our average results) if producers keep stocking their ponds at their current densities using F₁-hybrids. However, for sustainability reasons, it is advisable to stock F₁-hybrid animals at lower densities, the gain in performance allowing producing the same amount of biomass with less input.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the second part of the 20th century, genetics allowed large improvements in agricultural industries (poultry for example). Aquaculture could benefit from the use of such methodologies as well (Gjedrem, 1997; Argue and Alcivar-Warren, 2000.) Because domestication in modern aquaculture is still recent and not fully achieved, the aquacultured animals are not totally adapted to rearing conditions yet; therefore the benefits of genetics in aquaculture could

be even higher than in traditional agriculture. Many experimental genetic improvement programs have been developed during the past 10–15 years at different levels and in different parts of the world for molluscs, finfishes and crustaceans (Gjoen and Bentsen, 1997; Moss, 2002). They all aim at helping aquaculture industries to be competitive and sustainable in their own socio-economical and bio-technical contexts. But a genetic improvement strategy which proved to be efficient in a given context on a given biological model is not necessarily efficient in another context.

The BSD programs on domestication and selection of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* during the last decade were implemented to support the growing industry exploiting this species

* Corresponding author. Tel.: +687 28 51 71; fax: +687 28 78 57.
E-mail address: egoyard@ifremer.fr (E. Goyard).



A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection

Julien de Lorgeril^{a,b}, Yannick Gueguen^a, Cyrille Goarant^b, Emmanuel Goyard^b, Chantal Mugnier^b, Julie Fievet^a, David Piquemal^c, Evelyne Bachère^{a,*}

^a Ifremer, CNRS, Université de Montpellier II, UMR 5119 "Ecosystèmes Lagunaires", Baco Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^b Ifremer, Nouvelle Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, France

^c Skuld-Tech, 134 rue du Curat, 34080 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 February 2008

Received in revised form 31 March 2008

Accepted 2 April 2008

Available online 19 May 2008

Keywords:

Crustacean

Decapoda

Penaeid

Vibrio penaeicida

Immune response

Penaeidin

Lysozyme

Anti-LPS factor

Crustin

Cysteine-rich peptide

Real-time PCR

ABSTRACT

Understanding of antimicrobial defence mechanisms of penaeid shrimp should help in the design of efficient strategies for the management and disease control in aquaculture. In this study, we have specifically analysed the expression in circulating hemocytes of antimicrobial peptides (AMPs) encoding genes, such as PEN2 and PEN3, ALF, crustin, lysozyme and a putative cysteine-rich peptide. We evidenced a relationship between the level of expression of some AMPs and the successful response of the shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, to circumvent a pathogenic *Vibrio penaeicida* infection. Additionally, significant differences in some AMP transcript amounts are evidenced between control, non-selected shrimp line and the third generation breeding of shrimp selected for their survival to natural *V. penaeicida* infections. On the basis of these results, it will now be of great interest to determine if these AMPs are directly involved in the resistance of shrimp to infection or if they only reflect other acquired defence mechanisms which can confer a resistance.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Understanding of antimicrobial defence mechanisms in penaeid shrimp (order: Decapoda, family: Penaeidae) is of prime importance to develop approaches for limiting the impact of infectious diseases which affect the shrimp aquaculture. Advances have been made in the field of immunity with the molecular characterization of several antimicrobial peptide (AMP) families by both biochemical and genomic approaches. Penaeidins have been the first AMP family characterized from the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Destoumiex et al., 1997). Isolated from hemocytes, the blood cells, they have been intensively studied regarding their *in vitro* antimicrobial activities and their gene expression in response to microbial stimulation

and *Vibrio* infections (for review, Bachère et al., 2004). With the development of large-scale genomic methods, penaeidins have been identified in almost all the shrimp species studied. They have been reported following several EST (Expressed Sequence Tag) pilot projects from individual non-immune challenged *L. setiferus* and *L. vannamei* (Gross et al., 2001) or from *Penaeus monodon* (Lehnert et al., 1999; Supungul et al., 2002; Tassanakajon et al., 2006) and *Fenneropenaeus chinensis* (Shen et al., 2004). This peptide family is now known to be ubiquitous for penaeid shrimp and original regarding structural characteristics (Yang et al., 2003; Cuthbertson et al., 2005, 2008). The penaeidin family is constituted by three subgroups of peptides (PEN2, PEN3 and PEN4) which present characteristic features according to amino acid sequences and motifs (Gueguen et al., 2006). The functional significance of such peptide diversity in animals is not yet well understood. Apart from penaeidins, several antimicrobial peptides have been also identified by genomic approaches. These studies reveal a high level of conservation between immune effector cDNAs from the different shrimp species, *L. vannamei* and *L. setiferus* (Gross et al., 2001), *L. stylirostris* (de Lorgeril et al., 2005), *P. monodon* (Supungul et al., 2004), *F. chinensis* (Shen et al., 2004; Dong and Xiang, 2007) and *P. japonicus*

Abbreviations: AMP, antimicrobial peptide; PEN, penaeidin; ALF, anti-lipopolysaccharide factor; EF-1 α , elongation factor-1 alpha; PCR, polymerase chain reaction; rtPCR, real-time PCR; Ct, cycle threshold; PL, post-larvae; G3, third generation.

* Corresponding author.

E-mail address: Evelyne.Bachere@ifremer.fr (E. Bachère).

0161-5890/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.molimm.2008.04.002

II.C. Travaux sur le génotypage de déterminants de résistance aux antibiotiques chez des bactéries d'intérêt en santé publique

Article 15 : Développement d'outils de surveillance moléculaire de la sensibilité des gonocoques aux pénicillines et découverte d'un nouveau génotype de la porine responsable d'une baisse de sensibilité

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2008, p. 3293-3300

0066-4804/08/5008.00+0 doi:10.1128/AAC.00020-08

Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 52, No. 9

Genotyping as a Tool for Antibiotic Resistance Surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* in New Caledonia: Evidence of a Novel Genotype Associated with Reduced Penicillin Susceptibility⁷

Frédérique Vernel-Pauillac,¹ Sobhan Nandi,² Robert A. Nicholas,² and Cyrille Goarant^{1*}

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Nouméa Cedex, New Caledonia,¹ and Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599-7365²

Received 6 January 2008/Returned for modification 4 February 2008/Accepted 11 June 2008

Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* continues to be a major concern in public health. Resistance of *N. gonorrhoeae* bacteria to penicillin G is widespread in most developed countries, which has necessitated a change to newer drugs for treatment of gonococcal infections. Recent reports indicate that resistance to these newer drugs is increasing, highlighting the need for accurate therapeutic recommendations. In some countries or communities, however, *N. gonorrhoeae* isolates are still susceptible to penicillin, so the use of this antibiotic for single-dose treatments of medically under-resourced patients is beneficial. In order to evaluate the adequacy and sustainability of this treatment approach, we explored the presence and prevalence of chromosomally mediated resistance determinants in *N. gonorrhoeae* isolates collected from 2005 to 2007 in New Caledonia. We developed two new real-time PCR assays targeting the *penB* and *mirR* determinants, to be used together with a previously described duplex assay targeting the *penA* and *ponA* determinants. The results of this study provided evidence that neither the most-common *mirR* determinants nor the most-resistance-associated *penB* alleles are currently circulating in New Caledonia, suggesting that penicillin should still be considered a valuable treatment strategy. Additionally, using our genotyping assay, we observed an unexpected *penB* genotype at a relatively high frequency that was associated with a decreased susceptibility to penicillin (average MIC, 0.15 µg/ml). Sequencing revealed that this genotype corresponded to an A102S mutation in the *penB* gene. The molecular tools developed in this study can be used successfully for prospective epidemiological monitoring and surveillance of penicillin susceptibility.

Neisseria gonorrhoeae is an obligate gram-negative human pathogenic bacterium that continues to be a public health problem worldwide (31). It is well documented that *N. gonorrhoeae* bacteria have evolved resistance mechanisms to almost all antimicrobial compounds that have been used to treat infections, an ability that has largely been related to the capacity for natural recombination between strains of the same species within a human host and with other members of the natural human mucosal flora, notably saprophytic and other pathogenic *Neisseria* species (7, 27, 29, 30).

Antimicrobial resistance mechanisms include the production of antibiotic-degrading enzymes, modification of the target site, and decreased influx or increased efflux of the antibiotic (1, 13). Penicillin G was used to treat gonococcal infections up to the mid-1980s, until the emergence and spread of resistance rendered the antibiotic ineffective. These strains utilized either plasmid-mediated or chromosomally mediated mechanisms to become resistant to penicillin G (9, 36). The spread of strains harboring a plasmid-encoded TEM-like β-lactamase has been very rapid and has forced the withdrawal of penicillin for treating gonococcal infections in many areas. Chromosomally mediated resistance to penicillin, tetracycline, and macrolides (25) in *N. gonorrhoeae* bacteria is also recognized as being a

major means by which resistance emerges and spreads in various geographic areas (10, 12, 19, 20, 22–24). The results of in vitro transformation experiments have shown that chromosomally mediated high-level penicillin resistance is complex and involves at least five genes, including those encoding altered alleles of the two essential penicillin-binding proteins PBP1 and PBP2 (*ponA* and *penA*, respectively) and porin (*penB*) and those resulting in overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux system (*mirR*). The results of recent studies have demonstrated that alterations in the *penA* gene which create a mosaic PBP2 decrease susceptibility to cefixime and ceftriaxone (16, 17, 21, 40).

The major porin of *N. gonorrhoeae* is encoded by *porB* that has two alleles, *porB1b* and *porB1a* (3). The results of early studies of chromosomally mediated penicillin resistance demonstrated that recombination near the *porB* locus was associated with a decreased susceptibility to antibiotics upon acquisition of the *penB* resistance determinant and that *penB* resistance was correlated with the *porB1b* allele (6, 10). The important sequence modifications of *porB1b* related to the decrease in susceptibility to penicillin have been located in loop 3 at positions 101 and 102 of the mature protein (12, 22).

Transcriptional regulation of the *mirCDE* operon in *N. gonorrhoeae* bacteria has been shown to be a major determinant in susceptibility to hydrophobic agents (14). The *mirR* promoter drives the transcription of *mirR* (a transcriptional repressor) in one direction and overlaps with the promoter for the *mirCDE* operon, which encodes three proteins that assemble to form the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump, in the other direction. The

* Corresponding author. Mailing address: Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Nouméa Cedex, New Caledonia. Phone: (687) 252666. Fax: (687) 273390. E-mail: cgoarant@pasteur.nc.

⁷ Published ahead of print on 30 June 2008.

Article 16 : Développement d'outils de surveillance moléculaire de la résistance des gonocoques aux fluoroquinolones

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 2009, p. 1264-1267
0066-4804/09/\$08.00+0 doi:10.1128/AAC.01104-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 53, No. 3

Quinolone Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Rapid Genotyping of Quinolone Resistance-Determining Regions in *gyrA* and *parC* Genes by Melting Curve Analysis Predicts Susceptibility[†]

Frédérique Vernel-Pauillac,¹ Tiffany R. Hogan,² John W. Tapsall,² and Cyrille Goarant^{1*}

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Nouméa Cedex, New Caledonia,¹ and WHO Collaborating Centre for STD, Department of Microbiology, The Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia²

Received 18 August 2008/Returned for modification 4 December 2008/Accepted 26 December 2008

We report a duplex real-time PCR assay for the simultaneous screening of mutations involved in fluoroquinolone resistance within *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions (QRDRs) in *Neisseria gonorrhoeae*. Our assay clearly detects all mutated QRDRs and allows the identification of common genotypes, whether the QRDRs contain single or double mutations, providing valuable epidemiological tools. When this method is used in conjunction with similar assays and in vitro analyses, essential antibiotic resistance surveillance can be performed for public health purposes.

Gonorrhea rates generally remain high in New Caledonia and Oceania, where penicillins are the recommended treatment (17, 19, 22). Increasing penicillin resistance means that fluoroquinolones are the next therapeutic option, but monitoring of relevant antibiotics for effectiveness for public health purposes (2, 7, 15, 16, 23) is required. However, resistance surveillance of gonococci is difficult because of culture-related and storage issues (3). Nonetheless, important epidemiological data may now be obtained if appropriate samples are conserved for genetic analysis (22).

The main determinant of fluoroquinolone resistance in gonococci is target site alteration by spontaneous mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA* and *parC* (1, 4, 6, 20). The codons 91 and 95 of *gyrA* and 86 through 88 and 91 of *parC* are those most frequently associated with quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* (1, 6, 11, 13, 14, 20). The stepwise acquisition of mutations leading to progressive increases in MICs begins first with *gyrA* changes resulting in a less susceptible or resistant phenotype, followed by *parC* alterations that increase the resistance. We developed and validated a real-time PCR-based genotyping method using hybridization probes to detect QRDR mutations within *gyrA* and *parC* for the epidemiological surveillance of quinolone susceptibility.

The QRDR sequences and ciprofloxacin MICs for a panel of 21 selected *N. gonorrhoeae* WHO reference strains and other strains from the WHO Collaborating Centre in Sydney, Australia, were first determined (Table 1). Strains were categorized as less susceptible when MICs were 0.06 to 0.5 µg/ml, as resistant when MICs were >0.5 to <4 µg/ml, and as highly resistant when MICs were ≥4 µg/ml (18). A further 14 clinical strains isolated at the Institut Pasteur in Cambodia, for which MICs of ciprofloxacin ranged from 0.016 to >32 µg/ml (Table

1), and a 1-year collection of 100 isolates (only 1 of which was quinolone-resistant *N. gonorrhoeae* [QRNG]) from the bacteriology laboratory of the Institut Pasteur in New Caledonia were also examined. The ciprofloxacin MICs for these isolates were determined by the Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) diffusion method using WHO reference strains as controls. All strains and isolates were handled and DNA was extracted as described previously (22). Oligonucleotides were designed using the LightCycler probe design software version 2.0 (Roche Diagnostics) and synthesized by Sigma-Proligo (Singapore Pty. Ltd). The 761-bp amplified region of *gyrA* was probed for mutations in codons 91 through 95 by melting curve analysis with a LightCycler Red 705 probe. For *parC* analysis, an anchor probe was combined with a LightCycler Red 670-labeled sensor probe overlapping codons 86 through 91 inside a 607-bp amplified *parC* product. Primer and probe sequences and the reaction conditions are summarized in Table 2. Amplification and melting curve analysis of the two genes were conducted in a single multiplex run with a final volume of 20 µl. This protocol ensures multiplex genotyping using a compensation color program to correct emission spectrum overlaps of the dyes. Controls in every experiment included a blank capillary tube, wild-type DNA, and mutated DNA.

We obtained highly reproducible results both within and between successive runs, with distinguishable melting curves for both QRDRs (Fig. 1). The *gyrA* QRDR genotyping analysis used the 705-nm wavelength and identified eight different melting peaks, based on melting temperatures (T_m s) and curve shapes (Fig. 1A). Wild-type *gyrA* QRDR sequences were identified by a mean $T_m \pm$ a standard deviation of $57.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Single mutants were easily evidenced by T_m s in the range of 50.5 to 51.5°C. Among single mutants, D95N and D95G were distinguished by T_m s of $50.7 \pm 0.05^\circ\text{C}$ and $51.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, respectively, both with a sharp melting peak, whereas S91Y, S91F, and D95G were not visibly distinguished from one another due to the overlap of their melting peaks, with a T_m of $51.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Four profiles specific to double mutants were clearly identified and confirmed by sequencing reactions (Table 1). In descending

* Corresponding author. Mailing address: Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Nouméa Cedex, New Caledonia. Phone: (687) 252666. Fax: (687) 273390. E-mail: cgoarant@pasteur.nc.

[†] Published ahead of print on 5 January 2009.

Article 17 : Développement d'outils de surveillance moléculaire de la sensibilité des pneumocoques aux fluoroquinolones

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Nov. 2008, p. 4155-4158
0066-4804/08/5208-00-0 doi:10.1128/AAC.00082-08
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 52, No. 11

Real-Time PCR Detection of *gyrA* and *parC* Mutations in *Streptococcus pneumoniae**

S. Page,^{1,2} F. Vernel-Pauillac,² O. O'Connor,¹ S. Bremont,³ F. Charavay,¹
P. Courvalin,³ C. Goarant,² and S. Le Hello^{1*}

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire d'Epidémiologie Moléculaire,¹ and Laboratoire de Recherche en Bactériologie,²
Nouméa, New Caledonia, and Institut Pasteur, Unité des Agents Antibactériens, Paris, France³

Received 20 January 2008/Returned for modification 30 March 2008/Accepted 12 August 2008

Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* mainly involves stepwise mutations predominantly in the *parC* and *gyrA* genes. We have developed a single-run real-time PCR assay for detection of the four most common mutations in the quinolone resistance-determining regions of these genes. This assay provides a useful tool for both clinical and epidemiological use.

Streptococcus pneumoniae is a major cause of community-acquired infections ranging from otitis media to pneumonia or meningitis (12). Strains resistant to multiple antibiotics have recently been reported and pose a risk of therapeutic failure (1). This observation has encouraged the use of newer fluoroquinolones against pneumococci (8) and has thus led to the emergence of fluoroquinolone-resistant clones. Prevalence rates have increased in Canada and have reached 14.3% in Hong Kong, while they have remained below 1 to 2% in the United States and Europe (3). The development of resistance to fluoroquinolones in pneumococci is a stepwise mutational process (7) that mainly occurs in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of the *parC* and *gyrA* genes (11). Several reports have noted that a significant proportion of isolates harboring first-step mutations had low or no phenotypic expression but had the potential to develop higher levels of resistance to fluoroquinolones when they suffered a second mutation, resulting in treatment failure (10). This evolution implies that microbiologists must be able to detect first-step, or "preresistant," mutants. The use of a nonmolecular test scheme for the detection of low-level resistance has been proposed, but this type of test lacks sensitivity and specificity (13). A powerful and highly specific technique for the detection of mutations within a DNA sequence is real-time PCR with fluorescent resonance energy transfer (FRET) hybridization probes. We report on the development of a real-time PCR assay that uses FRET probes for the single-run detection of the four most common resistance mutations within the QRDRs of the *parC* and *gyrA* genes of *S. pneumoniae*.

The *S. pneumoniae* strains were isolated, cultured, and identified as described previously (9). A total of 58 strains whose *parC* and *gyrA* genes had been sequenced previously were studied. They consisted of strain R6 and 3 R6 derivatives kindly provided by E. Varon (13), 10 mutants generated in vitro, reference strains CIP104485 and CP 1000, and 42 clinical isolates (37 from New Caledonia, 3 from Australia, and 2 from

Tahiti). Table 1 summarizes the known mutations, the results of disk agar diffusion (Bio-Rad), and the MICs determined by agar dilution, as described previously (13). DNA was extracted with a QIAamp DNA mini kit (Qiagen). The primers and probes were designed by using LightCycler probe design software (version 2) and were ordered from Prologo Singapore Pty. Ltd. The wild-type sequences of *gyrA* (GenBank accession number DQ175176) and *parC* (GenBank accession number DQ176507) were used for oligonucleotide design. By using the *parC* sequence, an LC-Red705-labeled sensor probe was designed to detect the Ser79Tyr (C-to-A substitution) and the Asp83Ala (A-to-C substitution) mutations. On the basis of the *gyrA* sequence, the LC-Red640-labeled probes were designed to detect the Ser81Phe (C:G substitution) and Glu85Lys (G:G substitution) changes. Probes for *gyrA* were designed so that each probe covered a mutation (Ser81 or Glu85) and had the same melting temperature (T_m), thus behaving as an anchor for the other probe. Table 2 summarizes the sequences of the primers and probes, the concentrations, and the reaction conditions. The primers led to 219-bp and 209-bp amplicons for *gyrA* and *parC*, respectively, which allowed the detection of mutations in *gyrA* and *parC* in a single run in 20- μ l capillaries of a LightCycler (version 2.0) instrument. The *parC*-specific primers were optimized at unequal concentrations to increase the fluorescence and allow better discrimination of the peak T_m s (2).

All *S. pneumoniae* strains had clearly distinguishable melting curves for both *gyrA* and *parC* (Fig. 1). Wild-type *parC* had a T_m of 65.7°C, and mutants with single Ser79 or Asp83 mutations had T_m s in the range of 62.1 to 63.0°C; the mutant with the Asp83Gly mutation, however, had a T_m of 64.8°C, which was still significantly lower than the T_m s of the wild-type genes. The T_m s were highly reproducible. The mutant with the double Ser79-Asp83 *parC* mutation had a T_m of 47.1°C. Wild-type *gyrA* had T_m s greater than 67°C, and the T_m s of all mutants were less than 65.5°C. The mean T_m for wild-type *gyrA* was 68.2°C, that for the mutant with a single Ser81 *gyrA* mutation was 62.0°C, and that for the mutant with a single Glu85 *gyrA* mutation was 64.2°C. The mutant with a double Ser81-Glu85 *gyrA* mutation had an intermediate T_m of 63.3°C. The results real-time PCR with FRET probes obtained for the clinical

* Corresponding author. Mailing address: Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 9-11 avenue Paul Doumer, BP 61, 98845 Nouméa Cedex, New Caledonia. Phone: 687.27.75.32. Fax: 687.27.33.90. E-mail: slehello@pasteur.nc.

[†] Published ahead of print on 25 August 2008.

Article 18 : Validation multicentrique des outils de surveillance moléculaire de la sensibilité des gonocoques aux antibiotiques

Clinical, Basic science, Behaviour, Epidemiology, Health services research

Correlation between antibiotic susceptibilities and genotypes in *Neisseria gonorrhoeae* from different geographical origins: determinants monitoring by real-time PCR as a complementary tool for surveillance

Frédérique Vernel-Pauillac,¹ Elisoa H Ratsima,² Bertrand Guillard,³ Régis Goursaud,¹ Camille Lethazer,¹ Sopheak Hem,³ Fabrice Merien,¹ Cyrille Goarant¹

► Supplementary materials 1 and 2 are published online only at <http://sti.bmj.com/content/10/00/issub00>.

¹Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia ²Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar ³Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia

Correspondence to: Dr Cyrille Goarant, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP61, Nouméa 98845, New Caledonia; goarant@pasteur.nc

Accepted 5 October 2009
Published Online First XXXX

ABSTRACT

Objective To determine in *Neisseria gonorrhoeae* (NG) isolates from different geographical areas whether monitoring of major determinants involved in chromosomal antimicrobial resistance correlated with phenotypes and could constitute complementary tools for surveillance.

Methods Real-time multiplex PCR assays targeting *penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA*, *gyrA* and *parC* determinants were applied to 169 NG extracts. Minimum inhibitory concentrations for penicillin and ciprofloxacin were determined by E tests, and β -lactamase production was analysed using nitrocefin discs.

Results A total of 169 NGs were examined, 110 from New Caledonia, 44 from Madagascar and 15 from Cambodia. Despite the heterogeneity in the number of isolates tested, the susceptibility trends observed in the different geographic areas studied showed a good fit with the multigenic genotypes. In addition, features related to a specific geographical diversity were found: (1) a high prevalence of strains harbouring the *porB1a* allele and showing reduced penicillin susceptibility in Madagascar and Cambodia (39% and 40% respectively); (2) almost all strains from Cambodia were resistant to the drugs tested (11/15 and 14/15 resistant to penicillin and ciprofloxacin respectively); and (3) identification of novel *penB* and *mtrR* genotypes associated with a moderately decreased penicillin susceptibility in New Caledonia (*mtrR* novel genotype in 4.7% of intermediate vs 14% of susceptible isolates).

Conclusions Showing a good correlation with phenotypic trends of susceptibility, multiplex real-time PCR assays could be used successfully for prospective epidemiological studies notably by characterising *mtrR* and *penB* determinants for their fundamental and complementary roles in increasing the antibiotic resistance. These molecular tools could also provide useful alternative surveillance tools for non-viable strains.

genes and regulatory regions resulting in an increasing resistance to structurally unrelated groups of drugs.^{3,4}

Reduced affinity of penicillin-binding proteins (encoded by *penA* and *penB*), overexpression of the *MtrC*–*MtrD*–*MtrE* efflux pump due to mutation in the promoter of *mtrR* and decreased permeation of the outer membrane induced by mutations in the porin *PorB1b* are the commonly described mechanisms of chromosomally mediated resistance.^{5–12} These mutations, referred to as *penA*, *penB*, *mtrR* and *porB* determinants, have been widely observed in clinical isolates displaying decreased susceptibility. In vitro transformation experiments demonstrated that their phenotypic expression was leading to a gradual increase in minimum inhibitory concentration (MIC) when successive variations accumulate.^{6,11,12}

Resistance to fluoroquinolones in NG involves mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA* and *parC*.^{13–15} Mutations in *gyrA* are considered as the first and most frequent, leading to either a less susceptible or a resistant phenotype, whereas *parC* changes constitute later steps always leading to complete resistance.^{16,17} Efflux activation or decreased porin permeability has also been suspected of being involved in resistance to quinolones.^{16,18}

Using real-time PCR with hybridisation probes, we genotyped these chromosomal determinants in NG isolates from different geographic areas (New Caledonia, Oceania; Madagascar, Africa and Cambodia, Asia). We then evaluated the correlation between these genetic variations and the susceptibility to the corresponding antibiotics in order to evaluate the predictive value of these molecular tools and their possible use in surveillance as a way to forecast forthcoming resistance and adapt recommendations.

MATERIALS AND METHODS

NG isolates

A total of 169 NG isolates from men or women were studied. They were isolated at the bacteriology laboratories of (1) Institut Pasteur of New Caledonia (110 isolates collected from October 2006 to October 2007); (2) Institut Pasteur in Antananarivo, Madagascar (47 isolates collected from March 2004 to March 2006); (3) Institut Pasteur in Phnom Penh, Cambodia (15 isolates collected over 2006). Most

Neisseria gonorrhoeae (NG) is the causative agent of gonorrhoea, one of the major sexually transmitted infections in many countries. Its remarkable ability to evolve resistance mechanisms threatens the use of most antimicrobial agents so that attention in an effective surveillance to limit the spread of multi-resistant strains has become an absolute necessity.¹

Penicillin resistance arises either as a consequence of antibiotic-degrading enzymes production² or from simultaneous genetic variations in endogenous

III. Projet de Recherche : La leptospirose en Nouvelle-Calédonie

III.A. La leptospirose, une maladie grave et méconnue

La leptospirose est considérée comme la anthroozoonose (ou zoonose, maladie commune à l'homme et à une ou plusieurs espèces animales) la plus répandue au niveau mondial (Plank & Dean 2000). Elle est également fréquemment décrite comme une maladie tropicale émergente. Ce caractère émergent est principalement lié aux modifications des modes de vie et de l'environnement, mais pourrait accroître son importance dans le contexte d'effets écologiques et météorologiques des changements climatiques globaux.

On estime que les formes graves de leptospirose représentent annuellement plus de 500 000 cas, principalement en région intertropicale dans des pays en voie de développement. L'attention du public et des autorités de santé internationales a été attirée sur cette maladie suite à un certain nombre de flambées épidémiques importantes au Nicaragua (Ashford *et al.* 2000), au Brésil (Lomar *et al.* 2000), en Inde et dans plusieurs pays d'Asie du Sud-est (Ko *et al.* 1999; Smythe 1999; Tangkanakul *et al.* 2000; Levett 2001; Masuzawa *et al.* 2001; Bharti *et al.* 2003) ainsi qu'un certain nombre de cas groupés liés à des activités collectives de loisirs comme, pour les 2 groupes de cas les plus célèbres, un triathlon dans l'Illinois en 1998 (Morgan *et al.* 2002) et un raid de pleine nature dans la partie Malaise de Bornéo en 2000 (Sejvar *et al.* 2003). Depuis ces groupes de cas célèbres, un nombre croissant de cas sont reliés à des activités de pleine nature, en pays tropicaux mais aussi tempérés et la pratique du canoë-kayak, des raids et de la randonnée, de la pêche de loisir en eau douce sont par exemple à considérer comme des activités pouvant conduire à une exposition à la leptospirose, s'ajoutant aux expositions professionnelles mieux connues.

La leptospirose est également une maladie parfois grave avec un taux de mortalité rapporté dans la littérature scientifique d'environ 10-15% mais atteignant parfois 52% (Plank & Dean 2000). Paradoxalement, elle demeure toutefois une maladie négligée et il est reconnu que les efforts de recherche qui lui sont consacrés ont longtemps été insuffisants. Même au sein des maladies reconnues négligées par l'OMS, elle demeure mal identifiée puisqu'elle n'apparaît dans cette catégorie de maladies que dans une sous-rubrique, comme l'une des zoonoses tropicales négligées, la privant ainsi d'une visibilité dont la recherche pourrait bénéficier. La

Public Library of Sciences (PLoS) a récemment créé un nouveau journal à diffusion libre en ligne consacré aux maladies tropicales négligées (PLoS Neglected Tropical Diseases) qui reconnaît plus explicitement la leptospirose dans cette catégorie de maladies nécessitant des efforts accrus de description, de recherche et de prise en charge.

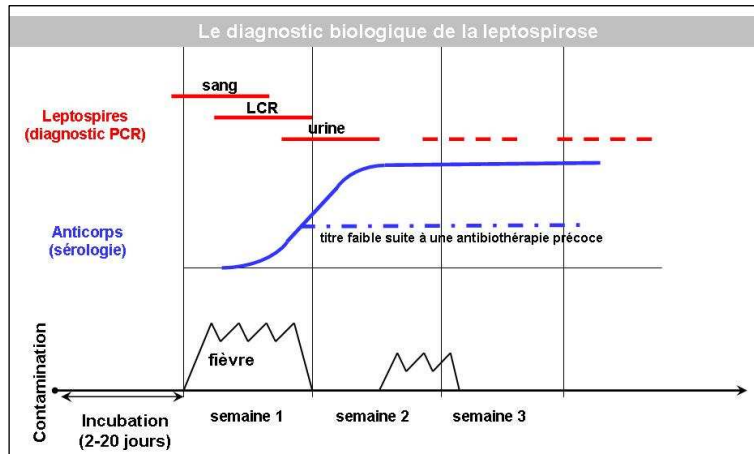
En 1994, plusieurs chercheurs travaillant sur la leptospirose se sont regroupés pour fonder la Société Internationale de la Leptospirose (« International Leptospirosis Society »), se fixant notamment pour objectif d'augmenter la connaissance sur cette maladie, aussi bien aux plans scientifique que sur celui de l'opinion publique ou de la sensibilisation des décideurs. Conjointement avec l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ils ont conçu et diffusé des éléments d'informations à destination des professionnels de santé ainsi que des personnes exposées à la leptospirose sous la forme d'un ouvrage en téléchargement libre sur leurs sites internet (World Health Organization & International Leptospirosis Society 2003). Plus récemment, en 2006, cette collaboration entre l'ILS et l'OMS a abouti à la création du « Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG) », dont les fonctions sont :

- de passer en revue les données épidémiologiques sur la charge de morbidité (« Burden of Disease ») de la leptospirose ;
- d'identifier les carences techniques et les priorités de recherche sur la leptospirose,
- pour faire des recommandations à l'OMS sur l'établissement de groupes de travail et les autres moyens par lesquels les questions techniques pourraient être traitées.

En effet, les estimations actuelles font apparaître que l'incidence des cas graves de leptospirose est aussi élevée que celle des cas graves d'infection par les virus de la dengue (environ 300 à 500 000 annuels), mais s'accompagne d'une mortalité plus élevée (Hartskeerl 2005).

L'International Leptospirosis Society et l'OMS soulignent notamment que la sous-estimation des cas de leptospirose et la mauvaise prise en charge thérapeutique qui en découle, sont notamment dues aux difficultés diagnostiques. En effet, le diagnostic de leptospirose est rendu délicat par un grand polymorphisme clinique. Le tableau clinique tel que décrit dans la plupart des manuels médicaux correspond à une hépatonéphrite hémorragique ou « syndrome de Weil ». Ce tableau, quoique caractéristique, ne représente qu'une petite partie des leptospiroses, très souvent moins de 30% des cas (Plank & Dean 2000). Les éléments qui orienteront la suspicion, en dehors de ces éléments cliniques, sont l'expérience propre à chaque praticien et le contexte sanitaire local, montrant l'importance d'une bonne surveillance capable de susciter une vigilance accrue dès qu'une augmentation, même légère, de l'incidence des cas confirmés apparaît. Dans les pays tropicaux notamment, comme chez le voyageur malade à son

retour, le diagnostic différentiel avec la dengue, le paludisme, la grippe, les hépatites virales, les rickettsioses, la fièvre jaune, les diverses fièvres virales hémorragiques... peut être particulièrement délicat. Le clinicien peut ainsi être amené à envisager la leptospirose devant tout tableau de syndrome grippal, toute atteinte fébrile de l'état général avec ou sans signe



hépatique ou rénal ; il devra alors envisager une confirmation biologique rapide. Ce diagnostic biologique de confirmation doit prendre en compte le stade de développement de la maladie en intégrant les éléments permettant de dater la maladie : il conviendra ainsi selon ce délai depuis

l'apparition des premiers symptômes de rechercher l'agent étiologique dans le sang puis dans l'urine, avant de rechercher les anticorps circulants. Les techniques mises en œuvre (culture, PCR spécifique et test de micro-agglutination MAT) restent limitées à un petit nombre de laboratoires spécialisés (seul l'Institut Pasteur en Nouvelle-Calédonie par exemple). Toutefois, même là où elle est endémique, la leptospirose est très largement sous-diagnostiquée : à titre d'exemple, la littérature rapporte une augmentation du diagnostic de 500% lors de la mise en place d'une surveillance active de la leptospirose à Hawaii (Sasaki *et al.* 1993). On voit là **l'intérêt évident qu'il y aurait à développer et rendre disponible un test de diagnostic rapide, utilisable en quelques minutes dans des laboratoires non spécialisés**, voire directement dans des centres médicaux périphériques, sur un échantillon d'urine ou de sang.

Il est admis qu'environ 90% des cas de leptospirose sont bénins et à guérison spontanée (Plank & Dean 2000). Toutefois, du fait que les formes légères échappent le plus souvent au diagnostic, une proportion beaucoup plus élevée des cas confirmés biologiquement nécessitent une hospitalisation. Ainsi, lors d'une épidémie ayant affectée la Nouvelle-Calédonie au cours du premier semestre 2008, le recueil des données individuelles d'hospitalisation a permis de montrer que 65% des cas confirmés avaient été hospitalisés, pour une durée moyenne de plus de 7 jours (Goarant *et al.* 2009). Dans ces cas sérieux ayant nécessité une hospitalisation, la prise en charge en unité de soins intensifs n'est pas rare, en fonction de l'évolution des paramètres hématologiques (une thrombopénie le plus souvent), biochimiques (insuffisance rénale, atteinte hépatique grave...) voire radiologiques ainsi que de l'appréciation de l'état

général liée à l'expérience du clinicien. Toutefois, les critères pronostiques manquent parfois à ces cliniciens pour différencier, lors d'une leptospirose nécessitant une prise en charge hospitalière, les cas graves de ceux qui évoluent, parfois rapidement, vers une guérison. L'utilisation d'un modèle animal de leptospirose reconnu comme pertinent et reproduisant assez fidèlement les leptospiroses humaines (Haake 2006) devrait permettre d'identifier un certain nombre de **marqueurs immunologiques ayant une valeur pronostique qui pourraient, après avoir été validés sur un échantillon de patients humains atteints de leptospirose, être utilisés comme critères d'aide à la décision par les cliniciens.**

Complicant nombre de questions touchant cette maladie, la taxonomie des Leptospires est particulièrement complexe. Cette complexité provient d'une classification multiple mais non concordante : historiquement, l'unité taxonomique de base chez les Leptospires est le sérovar (dont il existe à ce jour plus de 230), regroupés sur la base de leurs caractéristiques antigéniques en sérogroupes (au nombre d'une trentaine). Dans ce système historique, les espèces de Leptospires pathogènes étaient regroupées sous le vocable *Leptospira interrogans* s.l. (pour *sensu lato*), les saprophytes sous le vocable *Leptospira biflexa* s.l. Il convient de noter que ces acceptions ne sont plus valides.

Plus récemment, la taxonomie moléculaire et la génomique ont permis de définir plus d'une douzaine d'espèces génomiques de Leptospires pathogènes, parmi lesquelles *Leptospira interrogans* s.s. (pour *sensu stricto*, la seule acception rigoureuse actuellement), *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. meyerii*, *L. borgpetersenii* pour ne citer que les plus connues. La concordance entre la taxonomie sérologique historique et la taxonomie génomique actuelle s'est avérée mauvaise, un séroroupe pouvant regrouper des souches d'espèces différentes (jusqu'à 6 espèces) et même le sérovar, la plus petite unité dans la taxonomie sérologique, pouvant regrouper deux espèces génomiques différentes. La transition progressive entre ces deux systèmes taxonomiques est ralentie par l'importance majeure que conserve le diagnostic sérologique, seul capable d'identifier une leptospirose après les phases de bactériémie puis de bactériurie, ainsi que par les caractéristiques culturelles délicates des Leptospires pathogènes qui nécessitent des milieux de culture très spécifiques, une température d'incubation spécifique (30°C) et ont une croissance lente, rendant l'isolement du Leptospire étiologique particulièrement rare. Toutefois, l'avènement du diagnostic moléculaire par amplification génique permet de plus en plus fréquemment, dans les contextes où la leptospirose est suspectée précocement, de disposer de l'ADN de la souche infectante et d'envisager, dans un certain nombre de cas, une étude épidémiologique reposant sur une taxonomie plus rigoureuse

et plus fine que celle qu'offrait la sérologie. Ainsi, lors de l'épidémie du début de l'année 2008 en Nouvelle-Calédonie, plus de la moitié des cas confirmés ont permis l'isolement de l'ADN du *Leptospire* infectant, puisque 53% des cas ont été identifiés par PCR, 56% étant confirmés par sérologie (total >100% du fait de cas diagnostiqués par les 2 techniques) (Goarant *et al.* 2009).

Les *Leptospires* saprophytes constituent un composant naturel de la flore bactérienne des écosystèmes d'eau douce ou humides et ont la capacité de se multiplier dans l'environnement ; les *Leptospires* pathogènes sont seuls capables d'infecter des animaux et sont réputés incapables de se multiplier en dehors d'un hôte animal. En milieu synthétique, les souches saprophytes ont une croissance beaucoup plus rapide que les pathogènes, rendant l'isolement et la culture de souches pathogènes depuis des échantillons environnementaux particulièrement délicats. La cohabitation dans les écosystèmes naturels de ces deux groupes de *Leptospires* a conduit à une description historique de l'écologie des *Leptospires*, par des travaux utilisant le plus souvent des approches culturales (Smith & Self 1955; Smith & Turner 1961; Johnson & Harris 1967), très probablement plus représentative de celle des *Leptospires* saprophytes. Les travaux plus récents utilisant des approches moléculaires demeurent rares bien que les connaissances génomiques et les outils moléculaires disponibles permettent maintenant de les mener à bien (Ganoza *et al.* 2006).

III.B. La leptospirose à l'ère de la génomique

Comme pour les autres pathogènes, l'avènement des techniques moléculaires a révolutionné non seulement le diagnostic, mais aussi les approches mises en œuvre dans le cadre de la recherche. Dans le cadre du diagnostic, nous l'avons discuté plus haut, l'apport de la PCR a permis un diagnostic de certitude précoce, favorisant une prise en charge rapide et adaptée dans un contexte de diagnostic différentiel difficile. Ce diagnostic moléculaire contribue ainsi probablement à diminuer la mortalité associée à cette maladie.

Dans le cadre de la recherche, les génomes de plusieurs leptospires pathogènes et saprophytes ont été séquencés (Ren *et al.* 2003; Nascimento *et al.* 2004; Bulach *et al.* 2006; Picardeau *et al.* 2008), permettant ainsi, par des approches *in silico* de génomique comparative, d'identifier un pool de gènes liés au caractère pathogène, un pool de gènes associés à la survie hors d'un hôte, l'un et / ou l'autre combinés au « core genome », partie commune et indispensable à tous les leptospires (Picardeau *et al.* 2008). Le développement d'outils permettant de manipuler les gènes des leptospires n'en est qu'à ses débuts, par rapport à des

pathogènes plus facilement manipulables, mais a connu des progrès spectaculaires au cours de cette dernière décennie (Hardham & Rosey 2000; Saint Girons *et al.* 2000; Zuerner *et al.* 2000; Bourhy *et al.* 2005; Louvel & Picardeau 2007; Croda *et al.* 2008; Murray *et al.* 2008a; Picardeau 2008) et les travaux ayant développé et utilisé ces techniques ont déjà permis des progrès significatifs (Yang *et al.* 2006; Ristow *et al.* 2007; Murray *et al.* 2008a; Murray *et al.* 2008b). Enfin, comme mentionné plus haut, l'utilisation des approches moléculaires à la recherche et à la caractérisation de leptospires dans les échantillons environnementaux pourrait permettre une meilleure connaissance des cycles de la leptospirose, ouvrant ainsi la porte à de nouvelles perspectives de lutte (Ganoza *et al.* 2006).

Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen

Albert I. Ko^{*,†}, Cyrille Goarant[§] and Mathieu Picardeau^{||}

Abstract | Leptospirosis is a zoonotic disease that has emerged as an important cause of morbidity and mortality among impoverished populations. One hundred years after the discovery of the causative spirochaetal agent, little is understood about *Leptospira* spp. pathogenesis, which in turn has hampered the development of new intervention strategies to address this neglected disease. However, the recent availability of complete genome sequences for *Leptospira* spp. and the discovery of genetic tools for their transformation have led to important insights into the biology of these pathogens and their and pathogenesis. We discuss the life cycle of the bacterium, the recent advances in our understanding and the implications for the future prevention of leptospirosis.

Zoonotic disease

An infectious disease of animals that can be transmitted to humans, whatever its transmission mode (vector borne, directly or indirectly through a product derived from the host animal), and that causes a disease syndrome in susceptible individuals.

^{*}Division of Infectious Disease, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York 10021, USA.

[†]Gonçalo Mantz Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil [Au: please provide postcode]

[§]Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire de Recherche en Bactériologie, Nouméa, New Caledonia. [Au: please provide postcode]

^{||}Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, 28 Rue de Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Correspondence to M.P.
e-mail: mathieu.picardeau@pasteur.fr
doi:10.1038/nrmicro.2208

Descriptions of leptospirosis-like syndromes were reported in the scripts of ancient civilizations¹, but the first modern clinical description of leptospirosis was published by Weil in 1886 (REF. 2). In a landmark study in 1916, Inada *et al.* isolated leptospires, identified the organism as the causal agent of leptospirosis and determined that rats are a reservoir for transmission to humans³. Leptospires were subsequently isolated from a wide range of animal reservoir species and classified into serogroups and serovars as a function of their antigenic determinants (BOX 1).

Leptospirosis, a zoonotic disease with a worldwide distribution, is now recognized as an emerging infectious disease⁴. Over the past decade, outbreaks during sporting events, adventure tourism and disasters have underscored its ability to become a public health problem in non-traditional settings⁴⁻⁶. However, leptospirosis is a neglected disease that places its greatest burden on impoverished populations from developing countries and tropical regions⁶. In addition to being an endemic disease of subsistence farmers^{1,4,5}, leptospirosis has emerged as a widespread problem in urban slums, where inadequate sanitation has produced the conditions for rat-borne transmission⁷⁻⁹. More than 500,000 cases of severe leptospirosis are reported each year, with case fatality rates exceeding 10%¹⁰. This Review focuses on the pathogenesis of leptospirosis and then highlights the recent advances in the field with respect to the genetic approaches that have been recently developed and the virulence factors that have been discovered.

The question mark-shaped bacterium

The genus *Leptospira* belongs to the phylum Spirochaetes and comprises saprophytic and pathogenic species¹¹ (BOX 1). Saprophytic leptospires, such as *Leptospira biflexa*, are free-living organisms found in water and soil and, unlike pathogenic *Leptospira* spp., do not infect animal hosts¹. Leptospires are thin, highly motile, slow-growing obligate aerobes with an optimal growth temperature of 30 °C and can be distinguished from other spirochaetes on the basis of their unique hook or question mark-shaped ends¹² (FIG. 1a).

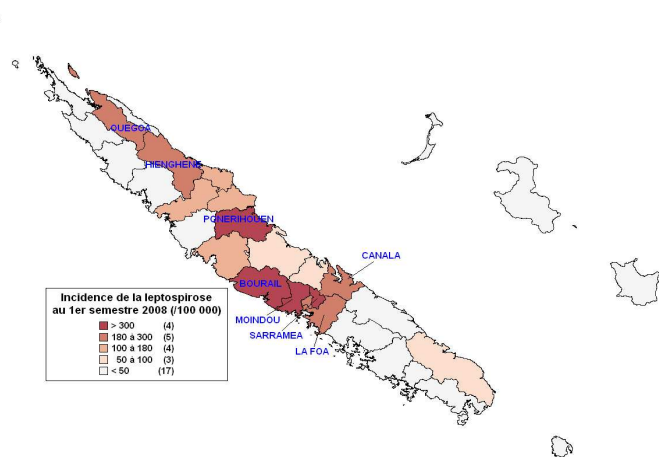
In addition to *L. biflexa*, the genomes of two pathogenic species, *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*, have been sequenced¹³⁻¹⁶. Most (77–81%) of the genes in leptospiral genomes do not have orthologues in the genomes of other spirochaetes, indicating that leptospires have diverged from other members of the phylum¹¹. Furthermore, comparative analysis of the genomes of the pathogenic and saprophytic species^{16,17} has provided insights into the genetic determinants that may be involved in pathogenesis (BOX 2).

The transmission cycle

Transmission of leptospirosis requires continuous enzootic circulation of the pathogen among animal reservoirs or, as they are commonly called, maintenance hosts (FIG. 2). *Leptospira* serovars demonstrate specific host preferences; for example, rats serve as reservoirs for the Icterohaemorrhagiae serogroup, whereas house mice (*Mus musculus*) are the reservoir for the Ballum

III.C. La leptospirose en Nouvelle-Calédonie

En Nouvelle-Calédonie, ainsi que dans les autres collectivités Françaises du Pacifique, la leptospirose est reconnue depuis de nombreuses années comme une pathologie majeure et un réel problème de santé publique. Son épidémiologie est typiquement endémique avec des flambées épidémiques lors des périodes de forte pluviométrie, comme ce fut le cas au début de l'année 2008 (Goarant *et al.* 2009).



Article 20 : L'épidémie de leptospirose du premier semestre 2008 en Nouvelle-Calédonie : questions diagnostiques et charge de morbidité

Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease

C. Goarant^{1,*}, S. Laumond-Barry^{2,*}, J. Perez¹, F. Vernel-Pauillac¹, S. Chanteau¹ and A. Guigon^{1,*}

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia

² Service des actions sanitaires, Direction des affaires sanitaires et sociales de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia

Summary A leptospirosis epidemic affected New Caledonia during the first semester of 2008. A total of 135 cases were diagnosed with a relatively low fatality rate of 3.7%. Heavy rainfalls, related to La Niña, favoured this epidemic. The PCR, routinely used, confirmed 54% of the cases, and the microagglutination test 56%. Epidemiological and economical data on this epidemic are presented and discussed.

keywords leptospirosis, epidemic, burden of disease, diagnostic techniques and procedures, meteorological factors

Introduction

Leptospirosis is the most widespread zoonosis occurring worldwide, possibly lethal, with epidemics associated with meteorological events, notably under the influence of the El Niño Southern Oscillation (ENSO) (Levett 2001). Its recent emergence or re-emergence (Bharti *et al.* 2003; Pappas *et al.* 2008) points to the lack of preparedness in low endemic locations, where epidemics may occur. There notably is a recognized need for a better assessment of its real incidence, medical and sociological impacts and costs in endemic or epidemic contexts (Smythe 1999; Hartskeerl 2005). In New Caledonia, leptospirosis is known to be endemic with epidemic bursts occurring during hot rainy periods (Merien & Perolat 1996; Berlioz-Arthaud *et al.* 2007a,b). In the first semester 2008, a La Niña situation induced heavy rainfalls and floods and was associated with an epidemic of human leptospirosis, causing 135 cases and 5 deaths.

Study methods

The population studied was all lab-confirmed cases of leptospirosis identified during the first half of 2008. All leptospirosis suspicions were asked a questionnaire about possible exposures, clinical signs and geographical localization. Medical and social data [number of days of hospitalization, including in intensive care units (ICU) and loss of workdays including days of hospitalization] were collected for every patient hospitalized. The standard cost of a hospitalization day in a peripheral health center, a

standard unit or ICU was obtained from the health centers and hospital respectively. For patients whose condition did not require hospitalization, a telephone inquiry of clinicians allowed to define a standard analysis and treatment regimen (leptospirosis diagnosis, hematology, biochemistry and a routine electrocardiogram) and an average loss of workdays per patient. The economical results were then extrapolated to 1 year based on the total number of leptospirosis cases diagnosed in 2008. The geographical origin of the patients was collected from either the return forms or by a telephone inquiry of the patients or their doctors.

The diagnosis was made at the Pasteur Institute of New Caledonia, the central reference laboratory for human leptospirosis. Both early molecular diagnosis, using a real-time PCR procedure with sera or urines (Merien *et al.* 2005) and late serological diagnosis using a panel of *Leptospira* strains of epidemiological relevance with the microagglutination technique (MAT) (Berlioz-Arthaud *et al.* 2007a) were used. Leptospirosis cases were categorized as confirmed (a positive PCR or a sero-conversion in paired samples) or probable (having both a clinical presentation of leptospirosis and a single MAT titre \geq 800) (Berlioz-Arthaud *et al.* 2007a).

Results

A total of 135 confirmed (101) or probable (34) leptospirosis cases were diagnosed during the first half of 2008. This number of cases, though lower than in large epidemics in 1997 and 1999 (Berlioz-Arthaud *et al.* 2007b) is much higher than the yearly average (Merien & Perolat 1996; Berlioz-Arthaud *et al.* 2007b) reflecting an epidemic

*These authors equally contributed to this work.

Cette maladie a été étudiée de façon historique à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC), notamment dans le laboratoire des Leptospores (Perolat *et al.* 1994; Merien & Perolat 1996; Letocart *et al.* 1997; Bourée *et al.* 1999; Mancel *et al.* 1999), précurseur de l'actuel Laboratoire de Recherche en Bactériologie. L'IPNC a ainsi développé les outils utiles à son

diagnostic (Merien *et al.* 1992; Merien *et al.* 2005) et à son étude et acquis au cours des années une expertise reconnue sur cette maladie, valorisée par nombre de publications ainsi qu'en 2006 le premier cours Pasteur régional Asie-Océanie « Leptospires et leptospiroses ». Avec une incidence dépassant certaines années les 100 cas pour 100,000 habitants en Nouvelle-Calédonie, elle est une pathologie infectieuse de tout premier plan et nombre de praticiens exerçant depuis plusieurs années, conscients de sa présence et de son diagnostic délicat, font preuve d'une vigilance diagnostique souvent salvatrice pour les malades.

Ainsi, l'épidémiologie générale de cette maladie en Nouvelle-Calédonie a été bien décrite, permettant notamment de mettre en évidence son caractère saisonnier et la variabilité interannuelle de son incidence liée aux facteurs météorologiques, notamment sous l'effet du phénomène El Niño (Merien & Perolat 1996; Berlioz-Arthaud *et al.* 2007b), mais aussi la variabilité géographique de son impact, avec des « points chauds » où l'incidence de cette maladie est maximale (Merien & Perolat 1996; Bourée *et al.* 1999; Berlioz-Arthaud *et al.* 2007b). La réalité de ces « points chauds » présentant une incidence de leptospirose humaine très supérieure à la moyenne peut évidemment être questionnée et refléter également (voire principalement) des régions où les praticiens ont une vigilance accrue et remplissent mieux leur obligation d'analyse et de déclaration. Toutefois, la répartition géographique de ces points chauds sur le territoire peut contribuer à s'expliquer par le climat plus humide de ces régions (Communes de la cote Est comme Canala, Poindimié, Hienghène et Ponérihouen) ou par la fréquence des inondations et la forte activité agricole, notamment d'élevage (Bourail).

Malgré cette bonne connaissance des praticiens et des populations, **l'écologie de cette maladie humaine et animale comportant une large composante environnementale demeure insuffisamment connue en Nouvelle-Calédonie.**

III.D. Projet de recherche

III.D.1. Objectifs

Le Laboratoire de Recherche en Bactériologie de l'IPNC a placé la leptospirose au centre de ses programmes de recherche. Dans ce cadre, nous aborderons chacun des 3 points mis en exergue dans les paragraphes précédents, dans l'objectif de contribuer à une meilleure connaissance et une meilleure gestion de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie.

Ainsi, nos projets de recherche visent à développer et valider un **test de diagnostic rapide** de la leptospirose, à rechercher des **indicateurs pronostiques** de sévérité utilisables par les cliniciens et à étudier, sur un site de forte incidence, l'**éco-épidémiologie** de la leptospirose, à

décrire au mieux son cycle, de ses réservoirs animaux et de son écologie lors des phases environnementales.

III.D.2. Développement d'un test de diagnostic rapide de la leptospirose

Le diagnostic de certitude de leptospirose repose soit sur la mise en évidence de la bactérie par culture (ou de son génome par amplification génique) soit sur la séroconversion du patient.

- Les Leptospires peuvent être mis en évidence par culture d'échantillons de sang, d'urine ou de liquide céphalo-rachidien lors des phases précoces de la maladie. Toutefois, la culture de ces germes est délicate, longue (jusqu'à 12 semaines) et fastidieuse. La mise en évidence de gènes spécifiques de Leptospires dans ces mêmes compartiments par amplification génique a ainsi pris un essor important au cours des dernières années. Elle permet un diagnostic extrêmement rapide des cas précoces, mais reste limitée à quelques laboratoires spécialisés pratiquant en routine la biologie moléculaire.
- Plus tardivement dans l'évolution de la maladie, la réponse immune aux leptospires est mise en évidence par la confirmation d'un titre élevé d'anticorps spécifiques ou par l'accroissement significatif de leur titre sur une courte période. Ces anticorps sont mis en évidence par le test de micro-agglutination. Cette technique ne permet donc qu'un diagnostic tardif au moment de la mise en place de la réponse humorale du patient.
- On notera qu'il existe en outre chez de nombreux patients une phase dite « silencieuse » où les leptospires (ou leurs génomes) ne peuvent plus être mis en évidence dans le sang alors même que la séro-conversion n'est pas encore entamée.

Malheureusement là encore, les techniques diagnostiques de référence ne sont disponibles que dans un nombre limité de laboratoires.

Projet de recherche : « Développement et validation d'un test de diagnostic rapide de la leptospirose »

Titre de l'étude	Développement et validation d'un test de diagnostic rapide de la leptospirose
Coordonnateur scientifique	Cyrille GOARANT, Institut Pasteur Nouvelle-Calédonie
Collaborateurs	Pr S. CHANTEAU, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie Drs M. PICARDEAU et P. BOURHY, Centre National de Référence de la leptospirose et Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur de Paris Dr F NATO, Plateforme Technique PF 5, Institut Pasteur de Paris Amina AMADOU, CERMES, RIIP, Niamey, Niger

Méthodologie	<ul style="list-style-type: none"> • Choix de cibles antigéniques conservées chez les leptospires pathogènes • Immunisation de souris et production d'anticorps monoclonaux (mAb) • Validation des anticorps mAb sur des cultures de souches de leptospires de références de différents sérovars, pures et en dilution • Choix des mAb offrant le meilleur rapport sensibilité / spécificité • Production pilote de tests rapide (typa bandelette) et tests sur des sérums de patients archivés
Objectifs	<ul style="list-style-type: none"> • Développer et valider un test de diagnostic rapide de la leptospirose utilisable sur des échantillons biologiques (sérum, urine...) • Évaluer son utilisation dans les conditions de centres médicaux périphériques en Nouvelle-Calédonie. • Envisager son utilisation dans un cadre vétérinaire

Cette étude est actuellement en cours.

III.D.3. La réponse immune de l'hôte comme composante intrinsèque de la maladie : indicateurs pronostiques déduits

La leptospirose humaine est une maladie aiguë fébrile, dont l'expression clinique évolue entre des formes asymptomatiques et des formes aiguës mortelles. Le polymorphisme clinique complique le diagnostic clinique, la forme la plus connue (une hépato-néphrite responsable d'un syndrome ictéro-hémorragique ou syndrome de Weil) ne représentant qu'environ 1/3 des leptospiroses humaines. Toutefois, certaines leptospiroses à évolution *a priori* favorables peuvent également se compliquer en formes graves avec atteinte polyviscérale et évolution fatale. Ainsi, des formes à la symptomatologie initialement fruste, pseudo-grippale, peuvent être d'un diagnostic différentiel délicat avec la grippe, le paludisme, la dengue ou les hépatites, mais sont également susceptibles d'évoluer vers des complications sévères à l'issue parfois fatale. Dans ce contexte, l'apparition de troubles respiratoires est reconnue comme étant de mauvais pronostic (Gouveia *et al.* 2008).

Le tableau clinique des patients présentant une leptospirose grave correspond à une définition communément admise du sepsis (Cavaillon *et al.* 2003; Philippart & Cavaillon 2007).

Le sepsis sévère est une évolution grave d'une infection, pouvant conduire à une défaillance polyviscérale fatale. Malgré d'importants progrès dans la compréhension de la physiopathologie et dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques, la mortalité due au sepsis reste toujours très élevée. La physio-pathologie du choc septique est complexe, impliquant de nombreux systèmes de l'organisme comme l'immunité acquise, la coagulation, ou le système neuro-endocrinien. La reconnaissance du pathogène est assurée par des récepteurs membranaires et par des molécules intra-cytosoliques, la liaison des ligands

pathogènes à ces molécules déclenche l'activation de cascades de réactions aboutissant à la synthèse de médiateurs pro- et anti inflammatoires responsables respectivement du Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) et du Syndrome de Réponse Anti-Inflammatoire Compensatoire (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome, CARS).

De la même façon, les leptospiroses fatales sont souvent liées à un tableau de choc septique. Ainsi, il nous est apparu intéressant de tenter de mettre en parallèle les différentes évolutions cliniques et les profils d'expression de médiateurs immunitaires, notamment cytokiniques, dont l'implication majeure dans le sepsis et le choc septique est reconnue (Bozza *et al.* 2007; van der Poll & Opal 2008). Certains auteurs (Tajiki & Salomão 1996; Diamant *et al.* 2002) rapportent une valeur pronostique chez les patients atteints de leptospirose, à des marqueurs de l'équilibre entre les réponses de type Th1 et Th2.

Article 21 : Recherche d'indicateurs pronostiques des formes graves de leptospirose : études sur un modèle animal

OPEN ACCESS Freely available online



Differential Cytokine Gene Expression According to Outcome in a Hamster Model of Leptospirosis

Frédérique Vernel-Pauillac, Cyrille Goarant*

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia

Abstract

Background: Parameters predicting the evolution of leptospirosis would be useful for clinicians, as well as to better understand severe leptospirosis, but are scarce and rarely validated. Because severe leptospirosis includes septic shock, similarities with predictors evidenced for sepsis and septic shock were studied in a hamster model.

Methodology/Principal Findings: Using an LD50 model of leptospirosis in hamsters, we first determined that 3 days post-infection was a time-point that allowed studying the regulation of immune gene expression and represented the onset of the clinical signs of the disease. In the absence of tools to assess serum concentrations of immune effectors in hamsters, we determined mRNA levels of various immune genes, especially cytokines, together with leptospiraemia at this particular time-point. We found differential expression of both pro- and anti-inflammatory mediators, with significantly higher expression levels of tumor necrosis factor α , interleukin 1 α , cyclo-oxygenase 2 and interleukin 10 genes in nonsurvivors compared to survivors. Higher leptospiraemia was also observed in nonsurvivors. Lastly, we demonstrated the relevance of these results by comparing their respective expression levels using a LD100 model or an isogenic high-passage nonvirulent variant.

Conclusions/Significance: Up-regulated gene expression of both pro- and anti-inflammatory immune effectors in hamsters with fatal outcome in an LD50 model of leptospirosis, together with a higher *Leptospira* burden, suggest that these gene expression levels could be predictors of adverse outcome in leptospirosis.

Citation: Vernel-Pauillac F, Goarant C (2010) Differential Cytokine Gene Expression According to Outcome in a Hamster Model of Leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis 4(1): e582. doi:10.1371/journal.pntd.0000582

Editor: Sheila Lukehart, University of Washington, United States of America

Received August 10, 2009; Accepted December 1, 2009; Published January 12, 2010

Copyright: © 2010 Vernel-Pauillac, Goarant. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Direction des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur and the French Ministry of Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cgoarant@pasteur.nc

Introduction

Leptospirosis is the most widespread zoonosis occurring worldwide with possible fatal outcomes [1]. Though most often an endemic disease, epidemics have been associated with particular meteorological events [2–4] or clusters of cases related to occupations or leisure activities [5–8]. It is notably highly prevalent in tropical areas, but some of the clusters of cases have been reported in temperate countries [7,8]. Its clinical presentation is highly variable and is often initially suggestive of influenza, malaria or dengue fever, making the differential diagnosis more hazardous in tropical countries, during dengue or influenza epidemics, or in areas of high malaria incidence [9]. However, because of a relatively high fatality rate in leptospirosis, increased medical care must be provided to some of the patients suffering leptospirosis. Validated prognostic factors to help forecast the evolution of a leptospirosis are scarce. Yet, they would be valuable for clinicians to decide whether their patients should only be treated with antibiotics, kept at the hospital in a standard unit or directed to an intensive care unit. Few data have been published addressing this question; furthermore, contrasting observations were obtained [10,11].

Severe leptospirosis manifestations include acute renal failure, caused by acute interstitial nephritis and pulmonary haemorrhage.

Spirochete invasion and toxicity of outer membrane components cause robust inflammatory host responses [12] leading to clinical manifestations reflecting a sepsis syndrome. This latter condition has been characterized as a dysregulation of the inflammatory response, including a massive release of pro-inflammatory cytokines that induces multiple organ dysfunctions. Concomitantly, compensatory mechanisms, mostly regulatory cytokine-mediated (although having protective effects to prevent overwhelming inflammation) may become deleterious and have been associated with an immune paralysis and poor outcome [13,14].

Cytokines are potent, pleiotropic, non-antigen-binding polypeptides secreted by cells of the immune system and are responsible for cell activation, differentiation and proliferation after they act on their target cells via specific receptors primarily through autocrine and paracrine stimulation. Their expression levels are largely studied in the context of septic shock and severe sepsis both for their possible prognosis value [13,15–17], as well as for a better understanding of sepsis physio-pathology [18–20]. Because of high similarities in clinical presentation of septic shock and severe leptospirosis, we hypothesized that strong similarities in immune gene expression between severe sepsis and severe leptospirosis could help predict the evolution of leptospirosis towards multiple organ failure or recovery.

Ainsi, le parallèle entre le sepsis sévère ou le choc septique et les cas graves de leptospirose apparaît particulièrement intéressant et pourrait permettre de dégager des indicateurs pronostiques de l'évolution des leptospiroses, ou d'évaluer dans quelles mesures les thérapeutiques nouvelles du choc septique pourraient être utiles au traitement des leptospiroses graves.

Une infection, comme certains traumatismes, peuvent activer le système immunitaire et déclencher la production de cytokines pro inflammatoires telles que Tumor Necrosis Factor (TNF) α , InterLeukin (IL)-1, High Mobility Group Box 1 (HMGB1), réels messagers moléculaires ayant pour rôle d'orchestrer une réponse immunitaire précise et dont l'effet sera de limiter les dommages tissulaires. Mais une production excessive de ce type d'effecteurs peut se révéler aussi dangereuse que le stimulus originel allant jusqu'à engendrer les caractéristiques pathologiques les plus dramatiques du choc septique et la défaillance poly-viscérale fatale (Ulloa & Tracey 2005). Ainsi un tableau de sepsis sévère n'est pas exclusivement causé par une infection. Par ailleurs, les antibiotiques administrés, s'ils peuvent contrôler la prolifération du pathogène, n'ont pas d'action directe sur la réponse inflammatoire systémique. Ainsi, depuis quelques années, les études ont montré une augmentation des concentrations des cytokines aussi bien pro- que anti-inflammatoires dans le sérum des patients en choc septique (Cohen 2002; Cavaillon *et al.* 2003; Bozza *et al.* 2007). Il a ainsi été mis en évidence que des concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires étaient des marqueurs de mauvais pronostic (Gogos *et al.* 2000; Fraunberger *et al.* 2006).

D'autres effecteurs que des cytokines, comme la procalcitonine, considérée comme un prototype des « hormokines », certains antagonistes naturels des cytokines (par exemple l'IL-1ra, antagoniste naturel de l'IL-1), certaines enzymes impliqués dans la réaction inflammatoire comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la nitric oxide synthase inductible (iNOS) pourraient également avoir une valeur pronostique dans le cadre du sepsis ou de la leptospirose. De même ou semble être également un paramètre prédictif de mortalité. Enfin la pentraxine-3 (PTX3), une protéine de même famille que la protéine C réactive (CRP) est également un marqueur d'inflammation. Son expression est induite par le TNF et l'IL-1 β mais aussi par l'IL-10. Sa valeur pronostique dans les cas graves de leptospirose a été suggérée.

Les médiateurs anti-inflammatoires sont également augmentés dans le sepsis. Ils seraient responsables d'un relatif état d'immunodépression, lequel est utile pour contrebalancer les effets des effecteurs pro-inflammatoires de façon à maintenir un équilibre entre les syndromes SIRS et CARS. Toutefois, lors de l'emballement des systèmes pro- et anti-inflammatoire, il en résulte une immunosuppression concomitante d'une réaction inflammation excessive.

Les premiers effets des leptospires sur l'activité procoagulante des cellules mononuclées du sang ont été publiés en 1983 (Miragliotta & Fumarola 1983). Lors d'expériences *in vitro*, des protéines de la membrane externe d'un *Leptospira* pathogène induisent l'expression de TNF α (Cinco *et al.* 1996), l'activation du facteur NF-kB, et stimulent en aval l'enzyme iNOS (Yang *et al.* 2000), de même les leptospires activent les monocytes, provoquant la production d'IL-6 (Dorigatti *et al.* 2005). Une association entre des niveaux plasmatiques élevés en TNF α et la sévérité de la maladie chez des patients atteints de leptospirose a également été publiée (Tajiki & Salomão 1996). Par ailleurs des niveaux comparativement plus élevés d'oxyde nitrique étaient observés chez des patients avec leptospirose sévère sans toutefois pouvoir associer ce paramètre avec la mortalité (Maciel *et al.* 2006). Malgré ces quelques études, les connaissances concernant la physiopathologie de la leptospirose et les facteurs pronostiques de celle-ci restent insuffisants.

La dérégulation immunologique est maintenant prise en compte dans l'appréciation des cliniciens dans certaines maladies et plusieurs marqueurs sont maintenant disponibles en routine. Ils incluent les cytokines IL-6, IL-8, TNF α , la protéine procalcitonine et la CRP. L'expression génique de ces marqueurs, dont les transcripts d'ARNm sont en quantité très limitée, peut être quantifiée par RT-PCR en temps réel de façon efficace et rapide (Stordeur *et al.* 2002; Overbergh *et al.* 2003). C'est ainsi que l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie a montré, pour la première fois *in vivo*, une réponse de type Th1 dans un modèle animal de leptospirose (Vernel-Pauillac & Merien 2006).

Sachant que les cytokines et quelques autres effecteurs expliquent et construisent le sepsis ainsi que d'autres désordres inflammatoires, nous chercherons à évaluer l'utilité de marqueurs choisis parmi ces effecteurs comme éléments pronostiques chez des patients atteints de leptospirose, pour suivre la progression clinique lors d'un état de sepsis lié à la leptospirose, en prédire la gravité et ainsi *in fine* améliorer la prise en charge précoce et adaptée des patients.

Projet de recherche : « Recherche d'indicateurs pronostiques de gravité lors d'une infection à *Leptospira* : suivis sur des patients hospitalisés »

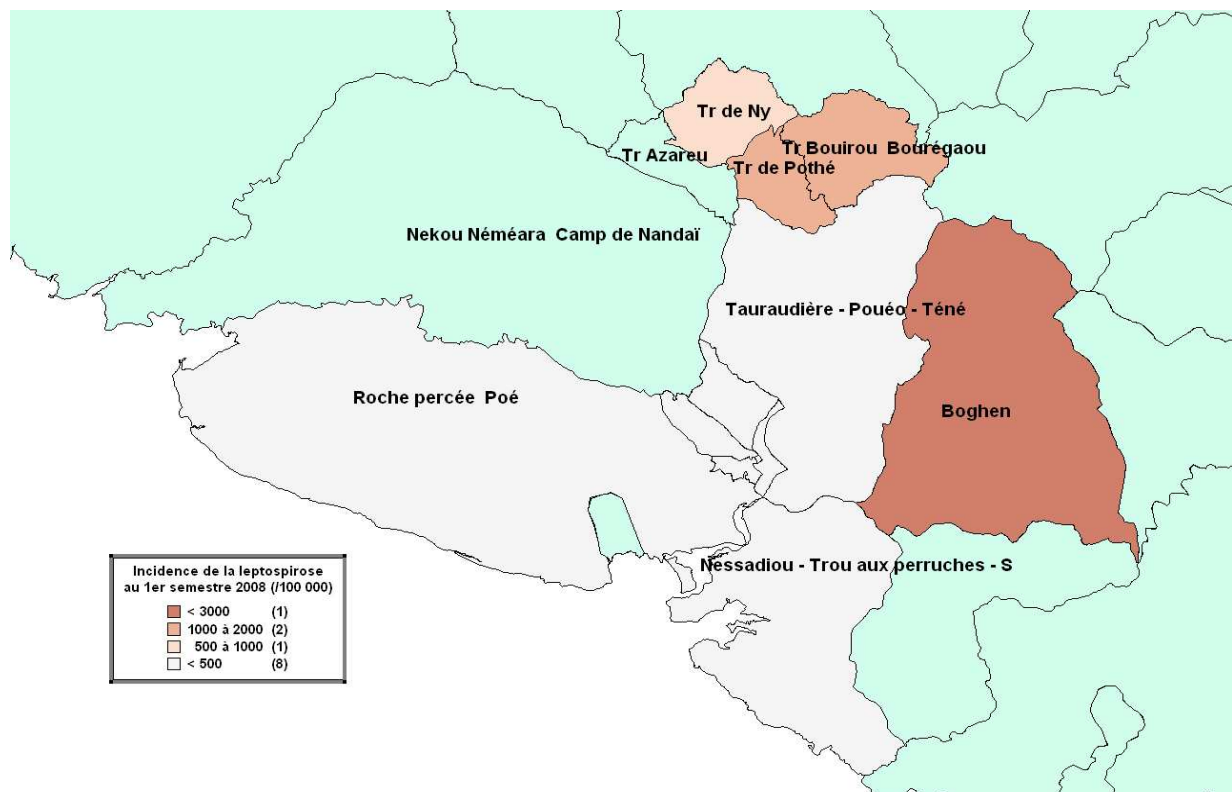
Titre de l'étude	Recherche d'indicateurs pronostiques de gravité lors d'une infection à <i>Leptospira</i> : suivis sur des patients hospitalisés
Coordonnateur scientifique	Cyrille GOARANT, Institut Pasteur Nouvelle-Calédonie
Clinicien principal	Docteur F. LACASSIN, Centre Hospitalier Territorial de Nouvelle-Calédonie
Lieu de la recherche	1 centre, Centre Hospitalier Territorial de Nouvelle-Calédonie
Méthodologie	Quantification de cytokines et autres effecteurs immunitaires (ELISAs) et étude de leurs niveaux d'expression (qRT-PCR) lors d'une infection à <i>Leptospira</i> chez des patients majeurs volontaires. Évaluation de l'évolution clinique en parallèle à l'évolution des effecteurs quantifiés et de leur expression génique.
Objectif principal Objectifs secondaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Caractériser la réponse cytokinique de patients atteints de leptospirose. ▪ Décrire la relation entre l'évolution clinique de la maladie et la nature de la réponse cytokinique ▪ Identifier des marqueurs pronostiques. ▪ Améliorer les connaissances de la physiopathologie des leptospiroses graves, évaluer les similitudes avec les entités mieux étudiées (choc septique, sepsis sévère), avec, à terme, la possibilité d'en déduire des approches thérapeutiques nouvelles.
Type d'étude	Il s'agit d'une étude descriptive de type longitudinal, conduite sur des patients hospitalisés. Il n'y a qu'un seul groupe de patients.
Nombre de sujets	N = 30-50 sujets
Population étudiée	<p><u>Critères d'inclusion</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient majeur et consentant - Leptospirose confirmée et date des premiers symptômes connus - Absence d'une autre pathologie infectieuse aigue simultanée (dengue, hépatite virale.....) <p><u>Critères d'exclusion</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient mineur ou non consentant - Evolution simultanée d'une autre pathologie infectieuse aigue
Analyse statistique	<p>Analyse avec SPSS 12, en fin de période d'inclusion. Pas d'analyses intermédiaires. Test du Chi-2 ou de Fisher pour les variables catégorielles. Test de Student, ou test de Mann-Whitney selon distribution pour les variables continues.</p> <p>Analyse en composantes principales pour étudier la distribution multidimensionnelle des données.</p> <p>La recherche d'associations entre une variable dépendante et des facteurs pronostiques potentiels sera d'abord effectuée en analyse univariée. Une modélisation de la relation entre une variable dépendante et des facteurs pronostiques sera ensuite réalisée par régression logistique descendante pas à pas conditionnelle, en incluant les variables trouvées significativement associées à l'analyse univariée, et celles non significativement associées quand le seuil de significativité était < 0,25.</p> <p>Pour les analyses statistiques, le seuil de signification est fixé à 5%.</p>

Cette étude est actuellement en cours.

III.D.4. Les schémas de circulation et de transmission des Leptospires pathogènes en Nouvelle-Calédonie.

L'histoire naturelle de la leptospirose est extrêmement complexe et mêle environnement, vecteurs (notamment mais pas exclusivement rongeurs) et espèces sensibles, dont l'homme. Dans un environnement insulaire comme celui de la Nouvelle-Calédonie où les échanges avec l'extérieur sont limités, une meilleure connaissance des populations de rongeurs (espèces, densités, répartition) et des souches de leptospires hébergées par ce réservoir, permettrait de mieux appréhender un des maillons peu connu de cette zoonose et de définir des stratégies de lutte adaptées. L'identification pour chaque souche virulente de leptospire du réservoir animal (animaux d'élevage et / ou sauvages) permettrait également d'améliorer les mesures et recommandations pour une prévention accrue.

Enfin, la caractérisation des milieux hydro-telluriques susceptibles de favoriser la survie voire la multiplication des leptospires permettrait également de mieux appréhender l'épidémiologie de la maladie et d'en déduire des approches préventives.



Identification des zones d'incidence maximale dans la région de Bourail

La recherche et le choix du site pilote s'est basée sur l'étude de l'épidémie du premier semestre 2008. Pour l'ensemble des cas humains, la zone la plus probable de contamination a été précisée par les fiches de déclarations obligatoires, complétées d'une enquête téléphonique.

Les cas et leurs zones d'infection respective ont été intégrés dans le logiciel PopGis (Communauté du Pacifique) intégrant les données démographiques de l'Institut des Statistiques et des Études Économiques. Le traitement de ces données et leur représentation graphique obtenue avec PopGis ont permis de confirmer la forte incidence de leptospirose dans la commune de Bourail (~500 cas annuels pour 100 000 habitants) et d'identifier, au sein de cette commune, 2 tribus, Pothé et Bouirou, ayant des incidences de l'ordre de 1000 à 2000 cas annuels pour 100 000 habitants.

Projet de recherche : « L'histoire naturelle de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie »

Titre de l'étude	L'histoire naturelle de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie
Coordonnateur scientifique	Cyrille GOARANT, Institut Pasteur Nouvelle-Calédonie
Collaborateurs	Fabrice BRESCIA, Institut Agronomique néo-Calédonien Dr S. BIMA-BLUM, vétérinaire libérale à Bourail Dr C. MARCHAL, Direction des Affaires Vétérinaires, Agro-alimentaires et Rurales Dr S. LAUMOND-BARNY, Direction des Affaires Sanitaires et Sociales
Site de l'étude	Nouvelle-Calédonie, tribus de Pothé et Bouirou (Bourail) pour les rongeurs et l'environnement
Autres lieux	Prélèvements vétérinaires sur la commune de Bourail, Prélèvements aux abattoirs de Bourail et Paita Chiens de la Société Protectrice des Animaux
Méthodologie	Recherche de <i>Leptospira</i> par amplification génique dans les échantillons animaux et environnementaux Identification des souches sur des bases moléculaires à l'aide d'outils développés dans l'étude Identification des cas humains (sérologie et / ou diagnostic par PCR) Synthèse des résultats et analyse des réseaux de circulation
Objectifs	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Développer des outils moléculaires permettant l'identification des souches de leptospires pathogènes ▪ Identifier les réservoirs animaux de chacune des souches identifiées dans des cas humains en Nouvelle-Calédonie ▪ Évaluer la prévalence chez les différentes espèces de rongeurs dans une zone de forte endémie ▪ Identifier et caractériser les réservoirs hydro-telluriques de leptospires. ▪ Intégrer ces résultats pour décrire les réseaux de circulation aboutissant aux infections humaines
Durée	Cette étude sera faite sur 2 années et prendra en compte les facteurs saisonniers

Cette étude est actuellement en cours.

III.D.5. En guise de conclusion : Vers une meilleure (re)connaissance de la leptospirose : mise en place d'un réseau de diagnostic

La leptospirose est une zoonose cosmopolite, considérée comme la zoonose la plus répandue (Levett 2001). Les humains sont des hôtes (et des victimes) occasionnels des leptospires. Ils s'infectent essentiellement par la peau et les muqueuses, le plus souvent de manière indirecte, à l'occasion d'un contact avec des eaux contaminées, parfois par contact direct avec des urines d'animaux infectés. D'autres modes de contamination, tels que la manipulation de tissus d'animaux malades, les morsures ou l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, interviennent beaucoup moins souvent (Faine 1987).

La leptospirose humaine peut passer inaperçue, se présenter sous une forme bénigne pseudo-grippale ou sous une forme aiguë plus ou moins grave et létale. De nombreuses études séro-épidémiologiques ont montré que les infections asymptomatiques étaient partout beaucoup plus nombreuses que celles nécessitant une prise en charge médicale. Les signes cliniques sont, dans l'ensemble, peu spécifiques (céphalées, myalgies, fièvre, etc.). Dans les formes sévères, des signes d'atteinte hépatorénale, des signes méningés ou des hémorragies oculaires peuvent orienter le diagnostic. La létalité des formes sévères peut dépasser 20% (Levett 2001; Abgueguen *et al.* 2008).

La leptospirose est étroitement liée aux conditions environnementales et climatiques et elle peut se manifester sur un mode endémique ou épidémique. Son incidence est élevée dans la zone intertropicale : en Asie du Sud Est (Van *et al.* 1998; Laras *et al.* 2002; Thai *et al.* 2008), dans le Pacifique (Perolat & Reeve 1992; Mancel *et al.* 1999; Katz *et al.* 2002; Berlioz-Arthaud *et al.* 2007a), en Australie (Smythe *et al.* 2000; Slack *et al.* 2006), dans l'Océan Indien (Duval *et al.* 1991; Yersin *et al.* 1998) et en Amérique Centrale et du Sud (Leal-Castellanos *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2004). En Afrique, son incidence reste mal connue, alors que les conditions climatiques et environnementales devraient lui être favorables dans de nombreuses régions. Le Bénin est le seul pays africain mentionné dans la synthèse sur la leptospirose humaine dans le monde, réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1999 (World Health Organization 1999). Des études ont été faites dans quelques pays (Hogerzeil *et al.* 1986; Onyemelukwe 1993; Bertherat *et al.* 1999), mais d'une manière générale, la leptospirose humaine est peu documentée dans les pays qui disposent de faibles ressources en laboratoire, situation malheureusement fréquente en Afrique sub-saharienne.

Les présentations cliniques de l'infection n'ont rien de spécifique et du fait que les cliniciens qui pourraient évoquer cette affection n'ont pas accès à une confirmation biologique, le

diagnostic de leptospirose a peu de chance d'être porté. Ainsi, la leptospirose est souvent méconnue ou ignorée, une situation résultant des effets conjugués d'une absence de capacité diagnostique et de la forte incidence de pathologies avec lesquelles la leptospirose présente un diagnostic différentiel délicat. Toutefois, lorsque cette maladie est prise en considération, sa mise en évidence est fréquente.

Article 22 : Mise en évidence d'une forte incidence de la leptospirose au Cambodge.

Surveillance active de la leptospirose humaine en milieu hospitalier au Cambodge.

Hospital based active surveillance of human leptospirosis in Cambodia.

A. Berlioz-Arthaud (1, 2), B. Guillard (3) C. Goarant (1) & Hem Sopheak (3)

(1) Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, B.P. 61, 98845 Nouméa, Nouvelle-Calédonie

(2) AFSSA – LERRPAS, Domaine de Pixérécourt, BP 4009, 54220 Malzéville

(3) Institut Pasteur du Cambodge, Phnom-Penh, Royaume du Cambodge

Auteur correspondant : Alain Berlioz-Arthaud (a.berlioz@afssa.fr)

Soumis au Bulletin de la Société de Pathologie Exotique

Résumé

La leptospirose est jusqu'à présent peu étudiée et probablement sous-estimée au Cambodge, où existent pourtant des conditions très favorables à sa circulation. Entre juin 2006 et juillet 2007, 612 patients admis à l'hôpital de Takéo et à l'hôpital Calmette de Phnom-Penh pour un syndrome compatible avec la leptospirose, ont été recrutés pour recherche des marqueurs biologiques de cette infection : mise en évidence de l'ADN bactérien par PCR et sérologie par ELISA-IgM et test de micro-agglutination (MAT).

Cent quatre vingt trois patients (29.9%) se sont révélés porteurs d'au moins un marqueur biologique de la leptospirose, dont 88 (14.4%) présentaient un profil d'infection aigue objectivé par une PCR positive. La proportion importante de patients avec un profil de phase immune (15.5%) suggère des contacts anciens avec les *Leptospira* et la possibilité d'infections peu ou pas symptomatiques. 13 sérogroupes de *Leptospira* ont été identifiés, avec prédominance de Panama, Pyrogenes et Australis, illustrant la grande diversité des hôtes réservoirs. Le séro groupe Icterohaemorrhagiae n'est retrouvé que dans 4% des cas. Aucun lien significatif entre l'infection et le sexe, la classe d'âge ou l'appartenance à une catégorie socioprofessionnelle n'a pu être établi, suggérant une exposition permanente de la population dans sa vie quotidienne plutôt que l'existence de groupes à risque majoré.

Cette étude, la plus vaste réalisée à ce jour sur la leptospirose au Cambodge confirme l'importance de cette zoonose, devant être prise en compte comme un problème réel de santé publique dans ce pays.

Abstract

Leptospirosis has been so far poorly described in Cambodia and is probably under diagnosed in the current local medical practices, although conditions to its active circulation exist in this country. Between June 2006 and July 2007, 612 patients admitted to Takeo hospital and Calmette hospital in Phnom Penh presenting with clinical symptoms compatible with leptospirosis, were recruited for biological investigation of leptospirosis markers: PCR detection of bacterial DNA and serology using an ELISA-IgM test and the micro-agglutination reference test (MAT).

One hundred eighty-three patients (29.9%) were found to be carrying at least one biological marker of leptospirosis, 88 (14.4%) showed an acute infection profile, evidenced by a positive PCR. The proportion of patients with an immune phase profile (15.5%) suggests former contacts with *Leptospira* and possible infections with little or no symptoms. 13 serogroups of *Leptospira* have been identified, with predominance of Panama, Pyrogenes and Australia, illustrating a probable wide range of animal reservoir hosts. Serogroup Icterohaemorrhagiae was found in only 4% of cases, contrasting with usual features of human leptospirosis. No significant link between infection and sex, age or occupation could be established, suggesting a permanent exposure of the population in its daily life rather than the existence of risk groups.

This study, the largest conducted to date on leptospirosis in Cambodia, confirms the importance of this zoonotic disease, that must be considered a real public health issue in this country.

Mots-clés

Key words

Leptospirose, séro groupe, Cambodge

Leptospirosis, serogroup, Cambodia

Projet en cours : « Mise en place d'un réseau de diagnostic de la leptospirose au sein du Réseau International des Instituts Pasteur et évaluation de son poids en santé publique »

Objectif global et résumé du projet :

Thématique

La leptospirose, considérée comme une maladie tropicale négligée et parfois décrite comme émergente, constitue un réel problème de santé publique dans nombre de pays en voie de développement, mais connaît aussi une recrudescence avérée dans des pays développés tempérés. Dans les pays tropicaux en développement, où les populations sont souvent moins médicalisées, les tableaux cliniques de syndromes grippaux fébriles posent un grave problème de diagnostic différentiel (grippe, dengue, hépatites, paludisme, fièvres hémorragiques virales...). Même face à un tableau clinique de syndrome ictéro-hémorragique, le clinicien n'envisage la leptospirose que s'il est sensibilisé à cette pathologie et s'il peut disposer, à un tarif et d'une accessibilité suffisants, d'un diagnostic de confirmation. Ainsi, certaines affections peuvent rester d'étiologie inconnue par défaut de disponibilité du diagnostic de leptospirose.

Le diagnostic de certitude de la leptospirose repose sur la mise en évidence de Leptospires dans les liquides biologiques (culture - qui est longue et très délicate - ou amplification génique à partir de sang, d'urine ou de LCR) ou par une séroconversion (nécessitant donc 2 prélèvements successifs), mise en évidence par le test de micro-agglutination (MAT) particulièrement délicat aussi et qui n'est mis en œuvre que dans un nombre limité de laboratoires spécialisés. La mise en place de ces techniques de diagnostic doit se faire en appui avec des centres référents expérimentés sur ces techniques.

Cette difficulté diagnostique est un des éléments contribuant significativement à la sous-estimation de cette maladie dans nombre de pays. Pourtant, un diagnostic précoce permet une prise en charge médicale efficace, améliorant nettement le pronostic pour le patient. Pour les gestionnaires de la santé publique, la reconnaissance de la présence de cette maladie zoonotique et environnementale et l'évaluation de son importance peuvent permettre d'orienter des décisions touchant aux priorités sanitaires locales ou régionales, à la politique de santé publique vétérinaire, à l'aménagement du territoire dans le cadre de la gestion hydrographique ou des déchets ou au contrôle des espèces animales sauvages ou en divagation.

Objectifs

Le but de notre projet est de développer, au sein de plusieurs instituts du RIIP dans des pays où la leptospirose pourrait être fortement sous-estimée des outils diagnostiques de cette maladie, d'évaluer la présence et l'importance de la leptospirose dans ces pays, par une étude de sa contribution à des syndromes cliniques de diagnostic différentiel complexe.

Démarche expérimentale

Pour parvenir à ces objectifs, notre projet a été découpé selon les 3 volets suivants :

1. Mise en place du diagnostic moléculaire de la leptospirose et aide à la mise en place d'autres techniques diagnostiques (mini-MAT ou à minima IGM-Elisa PanBio), piloté par l'IPNC
2. Conduite d'une étude chez des patients hospitalisés présentant un tableau clinique compatible avec une leptospirose pour évaluer la proportion de cas attribuables à cette affection, piloté par le CPC
3. Création et animation d'un réseau d'expertise Leptospirose au sein du RIIP pour mener à bien ces actions et envisager les développements ultérieurs.

Seuls une réelle prise de conscience de l'importance de cette maladie, un renforcement des capacités de son diagnostic et le maintien ou le renforcement des efforts de recherche tant fondamentale qu'appliquée en relation avec les données de la santé publique permettront de parvenir à des progrès significatifs de la lutte contre cette maladie à caractère émergent et à potentiel épidémique avérés.

III.E. Références bibliographiques

- Abgueguen P., Delbos V., Blanvillain J., Chennebault J.M., Cottin J., Fanello S. & Pichard E. (2008) Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *J Infect* **57**, 171-8.
- Ashford D.A., Kaiser R.M., Spiegel R.A., Perkins B.A., Weyant R.S., Bragg S.L., Plikaytis B., Jarquin C., De Lose Reyes J.O. & Amador J.J. (2000) Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* **63**, 249-54.
- Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F. & Gordon J.I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15718-23.
- Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A. & Gordon J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915-20.
- Berlioz-Arthaud A., Kiedrzyński T., Singh N., Yvon J.F., Roualen G., Coudert C. & Uliviti V. (2007a) Multicentre survey of incidence and public health impact of leptospirosis in the Western Pacific. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**, 714-21.
- Berlioz-Arthaud A., Merien F. & Baranton G. (2007b) Bilan de cinq années de surveillance biologique de la leptospirose humaine en Nouvelle-Calédonie (2001-2005). Laboratory based human leptospirosis surveillance in New Caledonia (2001-2005). *Bull Soc Pathol Exot* **100**, 133-8.
- Bertherat E., Renaut A., Nabias R., Dubreuil G. & Georges-Courbot M.C. (1999) Leptospirosis and Ebola virus infection in five gold-panning villages in northeastern Gabon. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 610-5.
- Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M.A., Levett P.N., Gilman R.H., Willig M.R., Gotuzzo E. & Vinetz J.M. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* **3**, 757-71.
- Bourée P., Benoist L. & Perolat P. (1999) Etude épidémiologique et clinique de la leptospirose à Bourail (Nouvelle Calédonie). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **92**, 51-6.
- Bourhy P., Frangeul L., Couvé E., Glaser P., Saint Girons I. & Picardeau M. (2005) Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the Spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. *Journal of Bacteriology* **187**, 3931-40.
- Bozza F.A., Salluh J.I., Japiassu A.M., Soares M., Assis E.F., Gomes R.N., Bozza M.T., Castro-Faria-Neto H.C. & Bozza P.T. (2007) Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* **11**, R49.
- Bulach D.M., Zuerner R.L., Wilson P., Seemann T., McGrath A., Cullen P.A., Davis J., Johnson M., Kuczek E., Alt D.P., Peterson-Burch B., Coppel R.L., Rood J.I., Davies J.K. & Adler B. (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14560-5.
- Cavaillon J.M., Adib-Conquy M., Fitting C., Adrie C. & Payen D. (2003) Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* **35**, 535-44.
- Cinco M., Vecile E., Murgia R., Dobrina P. & Dobrina A. (1996) *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 211-4.
- Cohen J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885-91.

- Croda J., Figueira C.P., Wunder E.A., Jr., Santos C.S., Reis M.G., Ko A.I. & Picardeau M. (2008) Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira*: Disruption of the LigB Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. *Infect Immun.*
- Diament D., Brunialti M.K.C., Romero E.C., Kallas E.G. & Salomão R. (2002) Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycoprotein. *Infection and Immunity* **70**, 1677-83.
- Dorigatti F., Brunialti M.K.C., Romero E.C., Kallas E.G. & Salomão R. (2005) *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. *Braz. J. Med. Res.* **38**, 909-14.
- Duval G., Michault A., Baranton G., Law-Koune J.D., Folio G., Bertil G. & Guiserix J. (1991) [Seroepidemiological study of human leptospirosis at Reunion Island]. *Rev Epidemiol Sante Publique* **39**, 135-41.
- Faine S. (1987) *Guide pour la lutte contre la leptospirose. Publication offset n°67*. World Health Organization, Geneva.
- Fraunberger P., Wang Y., Holler E., Parhofer K.G., Nagel D., Walli A.K. & Seidel D. (2006) Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock* **26**, 10-2.
- Ganoza C.A., Matthias M.A., Collins-Richards D., Brouwer K.C., Cunningham C.B., Segura E.R., Gilman R.H., Gotuzzo E. & Vinetz J.M. (2006) Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Medicine* **3**, e308.
- Goarant C., Laumond-Barny S., Perez J., Vernel-Pauillac F., Chanteau S. & Guigon A. (2009) Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Tropical Medicine and International Health* **14**, 926-9.
- Gogos C.A., Drosou E., Bassaris H.P. & Skoutelis A. (2000) Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* **181**, 176-80.
- Gouveia E.L., Metcalfe J., de Carvalho A.L., Aires T.S., Villasboas-Bisneto J.C., Queirroz A., Santos A.C., Salgado K., Reis M.G. & Ko A.I. (2008) Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* **14**, 505-8.
- Haake D.A. (2006) Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 12**, Unit 12E 2.
- Haine E.R. (2008) Symbiont-mediated protection. *Proc Biol Sci* **275**, 353-61.
- Hardham J.M. & Rosey E.L. (2000) Antibiotic selective markers and spirochete genetics. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 425-32.
- Hartskeerl R.A. (2005) International Leptospirosis Society: objectives and achievements. *Rev Cubana Med Trop* **57**, 7-10.
- Hawksworth D.L. (2001) The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **105**, 1422-32.
- Hogerzeil H.V., Terpstra W.J., De Geus A. & Korver H. (1986) Leptospirosis in rural Ghana. *Trop Geogr Med* **38**, 162-6.
- Johnson M.A., Smith H., Joeph P., Gilman R.H., Bautista C.T., Campos K.J., Cespedes M., Klatsky P., Vidal C., Terry H., Calderon M.M., Coral C., Cabrera L., Parmar P.S. & Vinetz J.M. (2004) Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis* **10**, 1016-22.
- Johnson R.C. & Harris V.G. (1967) Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospire. I. Growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology* **94**, 27-31.
- Katz A.R., Ansdell V.E., Effler P.V., Middleton C.R. & Sasaki D.M. (2002) Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases. *Am J Trop Med Hyg* **66**, 61-70.

- Ko A.I., Galvao Reis M., Ribeiro Dourado C.M., Johnson W.D., Jr. & Riley L.W. (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* **354**, 820-5.
- Krutmann J. (2009) Pre- and probiotics for human skin. *J Dermatol Sci* **54**, 1-5.
- Laras K., Cao B.V., Bounlu K., Nguyen T.K., Olson J.G., Thongchanh S., Tran N.V., Hoang K.L., Punjabi N., Ha B.K., Ung S.A., Insisiengmay S., Watts D.M., Beecham H.J. & Corwin A.L. (2002) The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg* **67**, 278-86.
- Leal-Castellanos C.B., Garcia-Suarez R., Gonzalez-Figueroa E., Fuentes-Allen J.L. & Escobedo-de la Penal J. (2003) Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. *Epidemiol Infect* **131**, 1149-56.
- Letocart M., Baranton G. & Perolat P. (1997) Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by Arbitrarily Primed PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 248-53.
- Levett P.N. (2001) Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 296-326.
- Lomar A.V., Diament D. & Torres J.R. (2000) Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* **14**, 23-39, vii-viii.
- Louvel H. & Picardeau M. (2007) Genetic Manipulation of *Leptospira biflexa*. In: *Curr Protoc Microbiol* (ed. by R. Coico TFK, J.M. Quarles, B. Stevenson, and R. Taylor (eds.)), p. 12E4. J. Wiley and Sons, Hoboken, N.J.
- Maciel E.A., Athanzio D.A., Reis E.A., Cunha F.Q., Queiroz A., Almeida D., McBride A.J., Ko A.I. & Reis M.G. (2006) High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Trop* **100**, 256-60.
- Mancel E., Merien F., Pesenti L., Salino D., Andibaud G. & Perolat P. (1999) Clinical aspects of ocular leptospirosis in New Caledonia (South Pacific). *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* **27**, 380-6.
- Mason K.L. & Huffnagle G.B. (2009) Control of mucosal polymicrobial populations by innate immunity. *Cell Microbiol* **11**, 1297-305.
- Masuzawa T., Dancel L.A., Miyake M. & Yanagihara Y. (2001) Serological analysis of human leptospirosis in the Philippines. *Microbiol Immunol* **45**, 93-5.
- Merien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G. & Saint Girons I. (1992) Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2219-24.
- Merien F. & Perolat P. (1996) Public health importance of human leptospirosis in the South Pacific: a five-year study in New Caledonia. *Am J Trop Med Hyg* **55**, 174-8.
- Merien F., Portnoi D., Bourhy P., Charavay F., Berlioz-Arthaud A. & Baranton G. (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters* **249**, 139-47.
- Miragliotta G. & Fumarola D. (1983) In vitro effect of *Leptospira icterohaemorrhagiae* on human mononuclear leukocytes procoagulant activity: comparison of virulent with nonvirulent strain. *Can J Comp Med* **47**, 70-2.
- Morgan J., Bornstein S.L., Karpati A.M., Bruce M., Bolin C.A., Austin C.C., Woods C.W., Lingappa J., Langkop C., Davis B., Graham D.R., Proctor M., Ashford D.A., Bajani M., Bragg S.L., Shutt K., Perkins B.A. & Tappero J.W. (2002) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* **34**, 1593-9.
- Murray G.L., Morel V., Cerqueira G.M., Croda J., Srikram A., Henry R., Ko A.I., Dellagostin O.A., Bulach D.M., Sermswan R., Adler B. & Picardeau M. (2008a) Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Immun.*

- Murray G.L., Srikrum A., Hoke D.E., Wunder E.A., Jr., Henry R., Lo M., Zhang K., Sermiswan R.W., Ko A.I. & Adler B. (2008b) The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.*
- Nascimento A.L., Verjovski-Almeida S., Van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E., Digiampietri L.A., Harstkeerl R.A., Ho P.L., Marques M.V., Oliveira M.C., Setubal J.C., Haake D.A. & Martins E.A. (2004) Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* **37**, 459-77.
- Onyemelukwe N.F. (1993) A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern Nigeria among people at occupational risk. *J Trop Med Hyg* **96**, 301-4.
- Overbergh L., Giulietti A., Valckx D., Decallonne R., Bouillon R. & Mathieu C. (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* **14**, 33-43.
- Perolat P., Merien F., Ellis W.A. & Baranton G. (1994) Characterization of *Leptospira* isolates from serovar Hardjo by ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Mapped Restriction Site Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 1949-57.
- Perolat P. & Reeve P.A. (1992) First evidence of leptospirosis in Vanuatu. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**, 557-9.
- Philippart F. & Cavaillon J.M. (2007) Sepsis mediators. *Curr Infect Dis Rep* **9**, 358-65.
- Picardeau M. (2008) Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Appl Environ Microbiol* **74**, 319-22.
- Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., Creno S., Kuczek E.S., Bommezzadri S., Davis J.C., McGrath A., Johnson M.J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R.L., Rood J.I., Lajus A., Davies J.K., Medigue C. & Adler B. (2008) Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE* **3**, e1607.
- Plank R. & Dean D. (2000) Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection* **2**, 1265-76.
- Rajilic-Stojanovic M., Smidt H. & de Vos W.M. (2007) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol* **9**, 2125-36.
- Ren S., Fu G., Jiang X.-G., Zeng R., Miao Y.-G., Xu H., Zhang Y.-X., Xiong H., Lu G., Lu L.-F., Jiang H.-Q., Jia J., Tu Y.-F., Jiang J.-X., Gu W.-Y., Zhang Y.-Q., Cai Z., Sheng H.-H., Yin H.-F., Zhang Y., Zhu G.-F., Wan M., Huang H.-L., Qian Z., Wang S.-Y., Ma W., Yao Z.-J., Shen Y., Qiang B.-Q., Xia Q.-C., Guo X.-K., Danchin A., Saint Girons I., Sommerville R.L., Wen Y.-M., Shi M.-H., Chen Z., Xu J.-G. & Zhao G.-P. (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **422**, 888-93.
- Ristow P., Bourhy P., McBride F.W., Figueira C.P., Huerre M., Ave P., Girons I.S., Ko A.I. & Picardeau M. (2007) The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. *PLoS Pathog* **3**, e97.
- Saint Girons I., Bourhy P., Ottone C., Picardeau M., Yelton D., Hendrix R.W., Glaser P. & Charon N. (2000) The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *Journal of Bacteriology* **182**, 5700-5.
- Sasaki D.M., Pang L., Minette H.P., Wakida C.K., Fujimoto W.J., Manea S.J., Kunioka R. & Middleton C.R. (1993) Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 35-43.
- Savage D.C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**, 107-33.
- Sejvar J., Bancroft E., Winthrop K., Bettinger J., Bajani M., Bragg S., Shutt K., Kaiser R., Marano N., Popovic T., Tappero J., Ashford D., Mascola L., Vugia D., Perkins B.,

- Rosenstein N. & Team. E.-C.I. (2003) Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerging Infectious Diseases* **9**, 702-7.
- Singh B.K., Campbell C.D., Sorenson S.J. & Zhou J. (2009) Soil genomics. *Nat Rev Microbiol* **7**, 756; author reply -7.
- Slack A.T., Symonds M.L., Dohnt M.F. & Smythe L.D. (2006) The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiol Infect* **134**, 1217-25.
- Slack E., Hapfelmeier S., Stecher B., Velykoredko Y., Stoel M., Lawson M.A., Geuking M.B., Beutler B., Tedder T.F., Hardt W.D., Bercik P., Verdu E.F., McCoy K.D. & Macpherson A.J. (2009) Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* **325**, 617-20.
- Smith C.E.G. & Turner L.H. (1961) The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bulletin WHO* **24**, 35-43.
- Smith D.J. & Self H.R. (1955) Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. *J Hyg (Lond)* **53**, 436-44.
- Smythe L., Dohnt M., Symonds M., Barnett L., Moore M., Brookes D. & Vallanjon M. (2000) Review of leptospirosis notifications in Queensland and Australia: January 1998-June 1999. *Commun Dis Intell* **24**, 153-7.
- Smythe L.D. (1999) Leptospirosis worldwide. *Weekly Epidemiological Report* **74**, 237-44.
- Stordeur P., Poulin L.F., Craciun L., Zhou L., Schandene L., de Lavareille A., Goriely S. & Goldman M. (2002) Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods* **259**, 55-64.
- Tajiki M.H. & Salomão R. (1996) Association of plasma levels of Tumour Necrosis Factor α with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clinical Infectious Disease* **23**, 1177-8.
- Tangkanakul W., Tharmaphornpil P., Plikaytis B.D., Bragg S., Poonsuksombat D., Choomkasien P., Kingnate D. & Ashford D.A. (2000) Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. *Am J Trop Med Hyg* **63**, 204-8.
- Thai K.T., Nga T.T., Phuong H.L., Giao P.T., Hung L.Q., Binh T.Q., Van Nam N., Hartskeerl R.A. & de Vries P.J. (2008) Seroepidemiology and serological follow-up of anti-leptospiral IgG in children in Southern Vietnam. *Acta Trop*.
- Ulloa L. & Tracey K.J. (2005) The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med* **11**, 56-63.
- Van C.T., Thuy N.T., San N.H., Hien T.T., Baranton G. & Perolat P. (1998) Human leptospirosis in the Mekong delta, Viet Nam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**, 625-8.
- van der Poll T. & Opal S.M. (2008) Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* **8**, 32-43.
- Vernel-Pauillac F. & Merien F. (2006) Proinflammatory and Immunomodulatory Cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity* **74**, 4172-9.
- Waldvogel F.A. (2004) Infectious diseases in the 21st century: old challenges and new opportunities. *Int J Infect Dis* **8**, 5-12.
- World Health Organization (1999) Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec* **77**, 237-42.
- World Health Organization W.H.O. & International Leptospirosis Society I.L.S. (2003) *Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. World Health Organization.
- Xu J. & Gordon J.I. (2003) Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10452-9.

- Yang C.W., Wu M.S., Pan M.J., Hong J.J., Yu C.C., Vandewalle A. & Huang C.C. (2000) *Leptospira* outer membrane protein activates NF- κ B and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2017-26.
- Yang H.L., Zhu Y.Z., Qin J.H., He P., Jiang X.C., Zhao G.P. & Guo X.K. (2006) In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. *BMC Genomics* **7**, 293.
- Yersin C., Bovet P., Merien F., Wong T., Panowsky J. & Perolat P. (1998) Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 933-40.
- Zuerner R., Haake D., Adler B. & Segers R. (2000) Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 455-62.

IV. Autres ouvrages ou publications dans des revues à comité de lecture

Styli 2003
Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

Le colloque « Styli 2003 » s'est tenu en Nouvelle-Calédonie en juin 2003. Il avait pour objectif de présenter les acquis scientifiques des différentes disciplines concernées par cette aquaculture : écologie des bassins, pathologie, physiologie, immunologie, nutrition et génétique. La participation d'une quinzaine de spécialistes extérieurs à la Nouvelle-Calédonie ainsi que la présence des partenaires de la filière ont permis, avec les chercheurs localement engagés dans ces recherches, d'entreprendre une réflexion critique sur les orientations du programme Desans (Défi Santé Stylo-rostris), programme dont ce colloque était l'évènement fondateur.

Mots-clés : Aquaculture marine, crevettes, Nouvelle-Calédonie, écologie, pathologie, physiologie.

Styli 2003
Thirty years of shrimp farming in New Caledonia

The conference « Styli 2003 » was held in June 2003 in New Caledonia. It examined research results in the fields related to this aquaculture: pond ecology, pathology, physiology, immunology, nutrition and genetics. The presence of industrial, institutional and scientific (local and outside) partners of the shrimp industry provided an opportunity to discuss the orientations of a new multidisciplinary project (Desans, Défi Santé Stylo-rostris) devoted to the understanding of shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) health in ponds.

Keywords: Mariculture, penaeids, New Caledonia, ecology, pathology, physiology.

38

actes de colloques

Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

actes de colloques

38

Goarant C., Harache Y., Herblaud A., Mugnier C.

38

actes de colloques

38

Ifremer

Ifremer

Styli 2003
Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

INRA Prod. Anim., 2007, 20 (3), 207-212

Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples

D. SAULNIER, Y. REYNAUD, I. ARZUL, L. MIOSSEC, F. LE ROUX, C. GOARANT
IFREMER, Génétique et Pathologie, F-17390 La Tremblade, France
Courriel : dsaulnie@ifremer.fr

Selon l'Office International des Epizooties (OIE) une maladie émergente désigne une maladie grave récemment reconnue, dont la cause peut, ou non, avoir déjà été établie, et qui est susceptible de se propager au sein d'une

L'une des raisons est le manque de données sur la situation épidémiologique habituelle des maladies sévissant en milieu marin en termes de prévalence, incidence et virulence notamment. Comme le soulignent Harvell *et al*

mortalité peut atteindre 80 à 100 % au sein des populations infectées et survient 6 à 24 jours post infection (Dishon *et al* 2005). Elle est préférentiellement observée lorsque la température de l'eau est de 17°C-26°C (Haenen

**Changes in Hemocyte Counts in *Litopenaeus stylirostris*
Subjected to Sublethal Infection and to Vaccination**

CYRILLE GOARANT AND ERIC BOGLIO

*Laboratoire de Recherche Aquacole IFREMER en Nouvelle-Calédonie,
Station d'Aquaculture de Saint Vincent, BP 2059, 98845 Nouméa Cedex,
New Caledonia (South Pacific)*



ELSEVIER

Aquaculture 191 (2000) 133–144

www.elsevier.nl/locate/aqua-online

Aquaculture

**Experimental infection models for shrimp vibriosis
studies: a review**

Denis Saulnier ^{a,*}, Phillipe Haffner ^a, Cyrille Goarant ^b,
Peva Levy ^a, Dominique Ansquer ^a

^a *Laboratoire d'Aquaculture Tropicale, Centre Océanologique du Pacifique, IFREMER, BP 7004,
98719 Taravao, Tahiti, French Polynesia*

^b *Laboratoire IFREMER, BP2059, Nouméa, New Caledonia*

Received 1 March 2000; accepted 9 May 2000



ELSEVIER

Aquaculture 164 (1998) 323–335

Aquaculture

**'Syndrome 93' in New Caledonian outdoor rearing
ponds of *Penaeus stylirostris*: history and
description of three major outbreaks**

I. Mermoud ^{a,*}, R. Costa ^b, O. Ferré ^b, C. Goarant ^c, P. Haffner ^d

^a *CIRAD / NC Programme Elevage BP 186, 98845 Nouméa, New Caledonia*

^b *Laboratoire Territorial de Recherche et Diagnostic Vétérinaire, BP 42, 98890 Païta, New Caledonia*

^c *Laboratoire de Recherche Aquacole de l'IFREMER en Nouvelle-Calédonie, Station de Saint-Vincent, BP
2059, 98846 Nouméa Cédex, New Caledonia*

^d *Laboratoire Biologie et Ecologie des Invertébrés Marins, IFREMER, Station de La Tremblade,
Ronce-Lez-Bains, BP 133, 17390 La Tremblade, France*