



HAL
open science

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

Cyrille Goarant

► To cite this version:

Cyrille Goarant. Epidémiologie et facteurs de virulence des bactéries du genre *Vibrio* responsables de mortalité de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Perspectives de lutte.. Autre [q-bio.OT]. Université de Polynésie Française, 2000. Français. NNT : . tel-00495067

HAL Id: tel-00495067

<https://theses.hal.science/tel-00495067>

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.

UNIVERSITÉ DE POLYNÉSIE FRANÇAISE

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POLYNÉSIE FRANÇAISE

Discipline : Sciences

présentée et soutenue publiquement

par

Cyrille GOARANT

le 29 juin 2000

**ÉPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE VIRULENCE DES BACTERIES DU GENRE *VIBRIO*
RESPONSABLES DE MORTALITE DE CREVETTES D'ELEVAGE EN NOUVELLE-CALEDONIE.
PERSPECTIVES DE LUTTE.**

Directeur de thèse : Bernard MARTIN

JURY

Président : M. P. Pérolat

M. P. Pérolat
M. Y. Richard
M. F. Berthe
M. B. Martin

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur, directeur de thèse.

« On est alors amené à penser que l'homme d'autrefois, au fur et à mesure de son accroissement numérique en ces lieux, épuisa la splendide réserve vitale qu'il avait à portée de la main, et l'on constate sur les rivages de la mer ce qui fut aussi montré dans les forêts ou dans les plaines : *les économies de cueillette ne peuvent durer qu'un instant de l'histoire humaine.* »

Anita Conti (1899-1997)
L'océan, les bêtes et l'homme
ou l'ivresse du risque

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à M. Bernard MARTIN, et à sa femme Claude pour m'avoir incité à entreprendre ce travail. Ils ont su notamment me convaincre de l'intérêt d'accepter le cadre contraignant d'une thèse, m'aider à mettre en forme l'ensemble de ce travail... et m'encourager lors des moments les plus difficiles.

J'adresse ma profonde gratitude à M. le Professeur Yves RICHARD, directeur du Département de Santé Publique Vétérinaire à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon et à M. le Docteur Philippe PEROLAT, directeur de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Que Franck Berthe, chercheur au laboratoire Génétique et Pathologie de l'IFREMER à La Tremblade trouve aussi ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail. J'espère qu'il le trouvera digne de la voie qu'il avait tracée.

Ce travail a été réalisé pour sa plus grande partie dans le cadre de mon activité au sein du Laboratoire Aquacole de l'IFREMER en Nouvelle-Calédonie. Que mes collègues de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent et de la délégation IFREMER en Nouvelle-Calédonie trouvent ici mes sincères remerciements pour leur aide, proche ou moins proche, dans ce travail. Les personnes notamment qui ont travaillé dans mon équipe au cours de ces années (Éric Boglio, Anne-Laure Marteau, Raphaël Brizard, José Herlin) ont vécu en ma compagnie les espoirs, déceptions et plaisirs de cette recherche. Mes collègues du Centre Océanologique du Pacifique de l'IFREMER à Tahiti que j'ai souvent sollicités trouvent ici aussi ma reconnaissance.

J'adresse également tous mes remerciements à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Plusieurs volets de ce travail ont été ou sont en cours de réalisation dans le cadre d'une collaboration avec cet institut. Les Docteurs Bernard Gentile (alors directeur de l'IPNC), Philippe Pérolat (alors chef du laboratoire des Leptospires de l'IPNC et actuel directeur de l'IPNC) et Fabrice Mérien (chef du laboratoire des Leptospires de l'IPNC) ainsi que le personnel du laboratoire des Leptospires ont œuvré pour que ce travail soit fructueux. Tous

m'ont toujours accueilli dans la bonne humeur et ont su m'apporter une grande aide scientifique dans des moments difficiles.

Le Dr Christian Hénin, océanographe à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à Nouméa reçoit aussi ma gratitude. Il m'a accueilli avec beaucoup d'intérêt et de patience lorsque j'ai voulu tenter de « voir plus loin ». Les modèles prédictifs issus de l'océanographie devraient rester présents à notre mémoire comme outils de gestion à plus long terme.

Les aquaculteurs de Nouvelle-Calédonie trouvent ici aussi ma gratitude. Ceux notamment qui ont accepté de prendre sur leur temps pour m'exposer leur vision des phénomènes, ou débattre de mes points de vue. Ces discussions ne sont jamais vaines. Ceux aussi qui m'ont ouvert leurs bassins, leurs cahiers... Ce n'est qu'avec votre aide que nous avancerons.

Que tous ceux qui m'ont appris à travailler, donné ma chance, ou aidé au cours de ces années ne se sentent pas oubliés. Philippe qui m'a tout appris des Vibrio, Franck qui m'a montré la voie, Denis qui a rapidement constitué un interlocuteur et une aide de choix et tous ceux avec qui j'ai eu plaisir à essayer de progresser.

*À Anne-Claire, Colas et Maël
ils ont « subi » ces épreuves au jour le jour
à travers mes horaires, mes humeurs...
sans reproche ni impatience.
Ils savent à quel point ils comptent pour moi.*

À mes parents, ma famille

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS	7
RESUME EN FRANCAIS	8
ENGLISH ABSTRACT	9
INTRODUCTION :	10
CHAPITRE I : EPIDEMIOLOGIE DU SYNDROME 93	14
I.1. ÉPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE : HISTORIQUE DU SYNDROME 93	14
I.2. ÉLÉMENTS CLIMATIQUES LIÉS AU DÉCLENCHEMENT D'ÉPISODES DE MORTALITÉ :	19
I.3. TYPAGE MOLECULAIRE DE <i>VIBRIO</i> ISOLES LORS D'ÉPISODES DE SYNDROME 93	23
I.4. SUIVI ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE <i>VIBRIO PENAECIDA</i> DANS LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS DE L'ÉLEVAGE DE CREVETTES PAR AMPLIFICATION GÉNÉTIQUE	34
CHAPITRE II : FACTEURS DE VIRULENCE DES <i>VIBRIO</i> RESPONSABLES DE MORTALITÉ DE CREVETTES D'ÉLEVAGE EN NOUVELLE-CALÉDONIE	40
II.1. VIRULENCE DE <i>VIBRIO PENAECIDA</i> EN FONCTION DU STADE DE DÉVELOPPEMENT DE <i>LITOPENAEUS STYLIROSTRIS</i>	41
II.2. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DES SURNAGEANTS DE CULTURE DE SOUCHES DE <i>VIBRIO</i> SPP. PATHOGENES	47
II.3. ÉTUDE D'UNE VOIE D'ENTRÉE POSSIBLE DU PATHOGENE : MISE EN ÉVIDENCE D'UNE CHITINASE CHEZ <i>VIBRIO PENAECIDA</i> SOUCHE AM 101, <i>V. NIGRIPULCHRITUDO</i> SOUCHE AM 102, <i>V. ALGINOLYTICUS</i> SOUCHE SF 5 ET RELATION ÉVENTUELLE AVEC DES LÉSIONS CUTICULAIRES (« POINTS BLANCS »).	56
CHAPITRE III : PERSPECTIVES DE LUTTE	69
III.1. ASPECTS ZOOTECHNIQUES ET ZOOSANITAIRES	69
III.2. MÉDICAMENT, "VACCINATION" ET IMMUNOSTIMULATION DES CREVETTES EN ÉLEVAGE	79
III.3. SÉLECTION GÉNÉTIQUE D'ANIMAUX PLUS RÉSISTANTS	81

<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	86
<u>PRESENTATIONS A CONGRES ET PUBLICATIONS</u>	95
PRESENTATION A CONGRES N° 1 :	95
PRÉSENTATION À CONGRÈS N° 2 :	97
PUBLICATION N° 1 :	99
PUBLICATION N°2 :	107
PUBLICATION N°3 :	114
PUBLICATION N° 4 :	122
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	129
<u>ANNEXES TECHNIQUES</u>	143
<u>APPENDICE : BASES BIOLOGIQUES ET HISTORIQUE DE L'AQUACULTURE DE CREVETTES</u>	152

Liste des illustrations

Figure 1 : Localisation des sites de mesure et de relevé des mortalité.....	19
Figure 2 : Autoradiogramme des profils électrophorétiques obtenus avec l'amorce SP...29	29
Figure 3 : Dendrogramme des types déduits des profils électrophorétiques en AP-PCR. 30	30
Figure 4 : Comparaison entre le dendrogramme obtenu par l'étude de typage et un dendrogramme hypothétique correspondant au cas où les postlarves seraient à l'origine de la contamination des bassins.	33
Figure 5 : Localisation des sites étudiés.....	34
Figure 6 : Lésions de la cuticule de type “ points blancs ”	63
Graphique 1 : Températures à l'extérieur du lagon et dans les bassins géniteurs de la SASV, et mortalité relevée dans les élevages.....	16
Graphique 2 : Survies moyennes annuelles sur les deux fermes de grossissement les plus anciennes de Nouvelle-Calédonie.	17
Graphique 3 : Tonnages mensuels pêchés au cours des années 1993 et 1995.	18
Graphique 4 : Températures à l'extérieur du lagon, dans le lagon et dans les bassins d'élevage au cours des années 1996 et 1997.....	20
Graphique 5 : Données zootechniques relatives à l'élevage dans lequel s'est effectué le suivi épidémiologique de <i>V. penaeicida</i>.....	37
Graphique 6 : Évolution de la prévalence de <i>V. penaeicida</i> et mortalité dans l'élevage suivi.	38
Graphique 7 : Comptages hématocytaires des crevettes après injection de 50µl de surnageant d'une culture de <i>V. nigripulchritudo</i> AM 102 à 25°C.....	50
Tableau 1 : Origine des souches sélectionnées pour le typage moléculaire.....	26
Tableau 2 : Aspects des cultures cellulaires après ajout de surnageants de cultures de <i>Vibrio</i> cultivés à 25°C.	51
Tableau 3 : Survie de crevettes injectées avec les surnageants de culture de <i>V. penaeicida</i> cultivé à différentes températures.....	52
Tableau 4 : Activités enzymatiques détectées dans les surnageants de culture de <i>V. penaeicida</i>.	53
Tableau 5 : Conditions des élevages comparant les postlarves issues de géniteurs ayant survécu au Syndrome 93 aux postlarves issues de géniteurs non sélectionnés.	83
Tableau 6 : Résultats des élevages expérimentaux avec la descendance d'animaux ayant survécu au Syndrome 93, comparés à des crevettes non sélectionnées.....	84

Résumé en français

La Nouvelle-Calédonie présente de nombreux atouts pour la pénéculture. Le ralentissement brutal de son développement en 1993 s'explique par l'émergence d'une pathologie saisonnière qui affecte les crevettes juvéniles en grossissement, mettant en cause des bactéries du genre *Vibrio* et qui a reçu le nom de Syndrome 93. *Vibrio penaeicida* et *V. nigripulchritudo* sont deux espèces au pouvoir pathogène particulièrement élevé qui affectent les élevages. Une étude de typage moléculaire a permis de préciser leur épidémiologie et de proposer quelques conseils d'ordre zoosanitaire. Un suivi épidémiologique par amplification génique est en cours pour *V. penaeicida*, qui montre l'importance des facteurs écologiques dans l'apparition des épisodes pathologiques. La pathogénicité de *V. penaeicida* a été étudiée en fonction du stade de développement de l'hôte, et des facteurs toxiques ont été mis en évidence dans les surnageants de culture. Une hypothèse a été émise sur la voie d'entrée du pathogène dans l'hôte. L'hypothèse d'un support plasmidique de la virulence a été émise et est actuellement étudiée. Des moyens de lutte ont été étudiés, des aspects de gestion zoosanitaires discutés. La sélection de lignées de crevettes à moindre sensibilité à l'infection apparaît comme une piste prometteuse.

Des perspectives de recherches sont proposées, notamment l'étude de l'écologie de ces *Vibrio* pathogènes dans l'environnement d'élevage, de la pathogénie des vibrioses engendrées en terme de facteurs de virulence, des relations hôte – pathogène. Ces travaux pourront s'appuyer sur les nombreuses connaissances acquises depuis plusieurs années pour d'autres espèces du genre *Vibrio*.

English abstract

New Caledonia has a number of assets for marine shrimp culture. However, its rapid growth encountered a slowdown in 1993, due to the emergence of a seasonal pathology that was named Syndrome 93. Involving bacteria from the *Vibrio* genus, this disease affects juvenile shrimp during grow out. Strains of significant importance belong to the species *Vibrio penaeicida* and *V. nigripulchritudo* and are highly pathogenic to juvenile shrimp. A molecular typing study was conducted in order to clarify their epidemiology and to draw zoosanitary advice. A wide epidemiological survey of *V. penaeicida* (currently in progress) demonstrates the important impact of ecological events in the outbreak of the disease. Virulence of *V. penaeicida* was studied as a function of host developmental stage. Toxic factors were shown in bacterial culture supernatants. An hypothesis was drawn regarding the route of entry of these bacterial pathogens into their host. Plasmids harboured by these pathogenic strains are currently being studied with regards to virulence. Means of minimising the impact of Syndrome 93 in grow out ponds have been studied, and zoosanitary practices are discussed. Genetic selection for a disease-resistant shrimp strain seem to be a promising issue. Research outlooks include the study of bacterial ecology in shrimp environment, pathogeny of Syndrome 93 disease with regards to *Vibrio* virulence factors and the study of the host – pathogen relationship. These future studies could eventually beneficiate from the background knowledge on other *Vibrio* species.

Introduction :

Le marché mondial de la crevette représente 2,5 à 3 millions de tonnes annuelles depuis 1990. Les prises des pêcheries plafonnent mais la pénéculture (aquaculture de crevettes Pénéides), qui s'est développée depuis les années 1970, a connu un véritable essor dans toute la ceinture tropicale du globe. De ce fait, la part de l'aquaculture pourrait dépasser les 50 % de la production mondiale de crevettes d'ici cinq ans.

Toutefois, si l'essor de la crevetticulture a été remarquable pendant une vingtaine d'années (du début des années 1970 au début des années 1990), sa croissance s'est stabilisée depuis quelques années. En effet, malgré un ensemble de facteurs qui semblaient favorables à son expansion (augmentation du nombre des pays producteurs, amélioration des techniques d'élevage, meilleures connaissances des besoins de la crevette, notamment en terme de nutrition...), la production aquacole mondiale de crevettes s'est quasiment stabilisée à partir de l'année 1992.

Les années 1992 et 1993 en particulier ont montré que la croissance de cette production ne pourrait pas être exponentielle, et que cette activité à forte valeur ajoutée comportait également des risques. Ce brusque ralentissement s'explique par l'apparition de pathologies parfois spectaculaires (Brock et Lea Master, 1992 ; Sano et Fukuda, 1987), ayant entraîné les premiers véritables effondrements de productions nationales, au premier rang desquels se trouvait la Chine. L'apparition et le développement de ces maladies infectieuses ont été très largement favorisés par l'anarchie avec laquelle ce développement s'était construit (Lin, 1989), et un ensemble de facteurs de risques écologiques ont ainsi pu être montrés, permettant, tardivement, une prise de conscience des risques engendrés par ce développement anarchique.

Les maladies ayant entraîné les déclinés les plus importants sont d'origine virale, et une vingtaine de virus pathogènes pour les crevettes Pénéides ont été découverts depuis le début des années 1980 (Lightner, 1992 et 1996). Toutefois, à l'image de la pisciculture, les pathologies bactériennes, bien que moins spectaculaires, font également payer un lourd tribut à la pénéculture. Au premier rang de ces bactéries pathogènes, le genre *Vibrio* affecte les élevages de tous les pays producteurs et toutes les espèces de Pénéides élevées (Lightner, 1988 a). Si les mortalités occasionnées par ces germes sont moins spectaculaires que celles

occasionnées par les virus, elles n'en ont pas moins un impact lourd et constant sur le développement et les résultats économiques de cette activité. Des œufs aux géniteurs en passant par les stades larvaires, postlarvaires et juvéniles, les *Vibrio* occasionnent des maladies qui peuvent aller d'une atteinte externe non létale de quelques individus à une mortalité de tous les animaux d'un bassin en quelques heures.

Face à ces pathologies bactériennes, le recours aux antibiotiques a permis pendant quelques temps de limiter les effets néfastes de ces germes pathogènes. Mais leur usage, parfois irréfléchi, a, comme ailleurs entraîné l'apparition d'antibiorésistances, souvent multiples, qui ont démontré les limites de cette démarche (Brown, 1989). De plus, comme dans la plupart des élevages aquatiques, la continuité avec le milieu extérieur existe et permet une vaste dispersion des germes résistants, favorisée par la proximité entre les différentes exploitations aquacoles. La recherche de solutions hygiénistes, d'ordre zoosanitaire ou écologique, semble maintenant favorisée face aux nombreux problèmes posés.

Les démarches écologiques ou éco-pathologiques ont mis en évidence un certain nombre de facteurs de risque de ces maladies, permettant une planification du développement de la pénéiculture. La meilleure prise en compte des fortes interactions écologiques dans l'apparition des maladies bactériennes a permis de mettre en exergue la possible acquisition de virulence par des germes ubiquistes réputés saprophytes, et l'étude de ces facteurs de virulence et de pathogénicité présente à cet égard un intérêt certain.

L'approche zoosanitaire se heurte pourtant au manque de connaissances sur l'épidémiologie de ces agents pathogènes. Les études concernant ces germes se heurtent fréquemment aux difficultés d'identification et de caractérisation des bactéries marines à l'aide des outils phénotypiques disponibles (Austin *et al.*, 1995 ; Aznar *et al.*, 1993), souvent inadaptés car destinés à des germes cliniques de médecine humaine. Le sérotypage n'a pas connu - contrairement à ce qui s'est fait dans l'étude épidémiologique des *Vibrio* pathogènes des Poissons - de développement majeur, même sur les espèces reconnues pathogènes dans toutes les régions productrices, comme *Vibrio harveyi*. Peu d'études sur les *Vibrio* pathogènes des crevettes Pénéides ont, à ce jour, eu recours aux techniques moléculaires, qui se sont pourtant avérées dans nombre d'autres domaines d'excellentes alternatives pour le typage à des fins épidémiologiques.

En Nouvelle-Calédonie, l'aquaculture de crevettes a débuté en 1970, à l'instigation des gouvernements membres de la Commission du Pacifique Sud (CPS) et sous l'égide de l'Organisation Mondiale pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). Ce programme de développement d'une aquaculture de crevettes marines s'est équipé d'une station expérimentale dans la baie de Saint Vincent, outil destiné à réaliser les travaux de recherche et développement de cette activité. La gestion scientifique et technique de cette station - logiquement baptisée Station d'Aquaculture de Saint Vincent SASV - fut confiée à l'IFREMER (CNEXO à l'époque) en 1973. C'est à la même époque que le CNEXO bâtissait le Centre Océanologique du Pacifique à Tahiti. Les activités de recherche de l'IFREMER à la SASV et au COP ont permis, à partir des années 1980, le développement en Nouvelle-Calédonie d'une activité privée d'aquaculture de crevettes. Le recours à une espèce exotique (*Litopenaeus stylirostris*, originaire du Mexique) pour ce développement a nécessité la maîtrise de l'ensemble du cycle biologique en captivité, maîtrise dans laquelle les travaux de l'IFREMER ont été déterminants, à côté d'autres grands découvreurs (voir Appendice 1 : bases biologiques et historiques de l'aquaculture de crevettes).

Quinze ans plus tard, la Nouvelle-Calédonie a produit en 1999 environ 1850 tonnes de crevettes sur 10 fermes couvrant une surface de près de 460 hectares.

Cette activité présente encore un bon potentiel de développement sur le Territoire, principalement dans la Province Nord où se situent la majorité des 1500 hectares de sites encore aménageables en fermes aquacoles. Elle peut prétendre constituer pour le Territoire un outil majeur de rééquilibrage économique entre les Provinces Nord et Sud de la Nouvelle-Calédonie : elle permet la création d'emplois en dehors de la conurbation Nouméenne, la valorisation de sites non exploitables par l'agriculture, elle représente le second secteur à l'exportation du Territoire (après le nickel), et générait en 1996 un chiffre d'affaires de plus de 10 millions US\$ (Coatanéa *et al.*, 1997). L'objectif d'une production annuelle d'environ 5 000 tonnes à l'issue de la prochaine décennie est affiché et semble être réalisable.

Comme dans nombre de pays producteurs, un des obstacles rencontrés au cours du développement de la filière commerciale de la pénéculture en Nouvelle-Calédonie a été la survenue d'un problème pathologique majeur, apparu en 1993 et qui a reçu le nom de Syndrome 93. Divers travaux ont été entrepris pour expliquer cette mortalité survenant de façon saisonnière dans les élevages de grossissement (Costa *et al.*, 1998 a, b). Au cours de ces travaux, certaines souches de bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées et identifiées (Costa *et*

al., 1998b), dont le pouvoir pathogène s'est montré particulièrement élevé en infection expérimentale (Le Groumellec *et al.*, 1996). Il a finalement été montré qu'une bactérie du genre *Vibrio* (*V. penaeicida*) était l'agent étiologique du Syndrome 93 (Saulnier *et al.*, 1999 et 2000). Notre travail a consisté, d'abord en une participation aux phases initiales de description du phénomène et de recherche de l'agent étiologique, puis dans l'étude de l'épidémiologie de cet agent pathogène (ainsi que d'autres souches et espèces de *Vibrio* pathogènes identifiés au cours de ces phases initiales), l'étude de la virulence de ces souches, enfin dans une recherche de solutions pratiques qui permettraient de limiter l'impact biotechnique et donc financier de cette pathologie.

Chapitre I : épidémiologie du Syndrome 93

I.1. Épidémiologie descriptive : historique du Syndrome 93

Présentation à congrès n° 1

Le Syndrome 93 est le nom que l'usage a consacré à des épisodes de mortalité observés à partir de 1993 en Nouvelle-Calédonie. L'absence d'un diagnostic fiable et rapide pour expliquer cette mortalité a été à l'origine du choix d'une locution floue. La suite a permis, nous le verrons, de préciser les causes de ce phénomène morbide, mais aucun nouveau nom n'a été adopté.

I.1.1. : Apparition du phénomène :

C'est donc au cours de l'année 1993 que les aquaculteurs de la baie de Saint Vincent signalent les premiers épisodes de mortalité anormale. Cette mortalité qui affecte les juvéniles dans les élevages de grossissement apparaît sous forme de brèves flambées épizootiques. Plusieurs centaines de crevettes moribondes sont retrouvées chaque jour sur les bords des bassins, aperçues en train de nager en surface (où elles sont la proie des oiseaux), ou retrouvées dans les éperviers au cours des échantillonnages de suivi des bassins. Cette mortalité apparaît initialement associée aux pics de mue des crevettes dans les bassins affectés. Les résultats des pêches finales, ainsi qu'un suivi plus assidu des bassins de grossissement montrent que cette pathologie peut également évoluer sur un mode plus chronique, soit directement, soit à la suite d'une flambée épizootique.

I.1.2. : Signes et symptômes :

Les crevettes atteintes sont affaiblies, ont un comportement anormal, nageant près des digues ou en surface. Les oiseaux plongeant pour se saisir de ces animaux signalent souvent l'apparition d'une mortalité anormale sur certains bassins. Comme souvent dans les élevages aquacoles, les symptômes observés (coloration sombre et terne du corps, blanchissement du muscle, présence d'un fouling branchial modéré à important, tube digestif vide, lésions de nécrose cuticulaire notamment) ne sont pas spécifiques d'une pathologie connue.

Les animaux présumés sains des bassins affectés montrent une très faible résistance au stress, et la mortalité est déclenchée en transférant ces animaux, ou à l'occasion de vidanges des bassins pour des pêches partielles.

I.1.3. : Les premières hypothèses :

Les prélèvements d'hémolymphe permettent de montrer un temps de coagulation très allongé. L'observation au microscope de cette hémolymphe montre systématiquement sa très forte colonisation par des bactéries mobiles. La mise en culture de ces hémolymphe permet l'isolement systématique de bactéries du genre *Vibrio* en nombre important, et permet de poser le diagnostic de vibriose. Toutefois, les vibrioses chez les crevettes Pénéides sont considérées comme des pathologies opportunistes (Boemare *et al.*, 1978 ; Lightner, 1988 a ; Brock et Lea Master, 1992) dont les causes primaires peuvent être infectieuses, toxiques, nutritionnelles, environnementales...

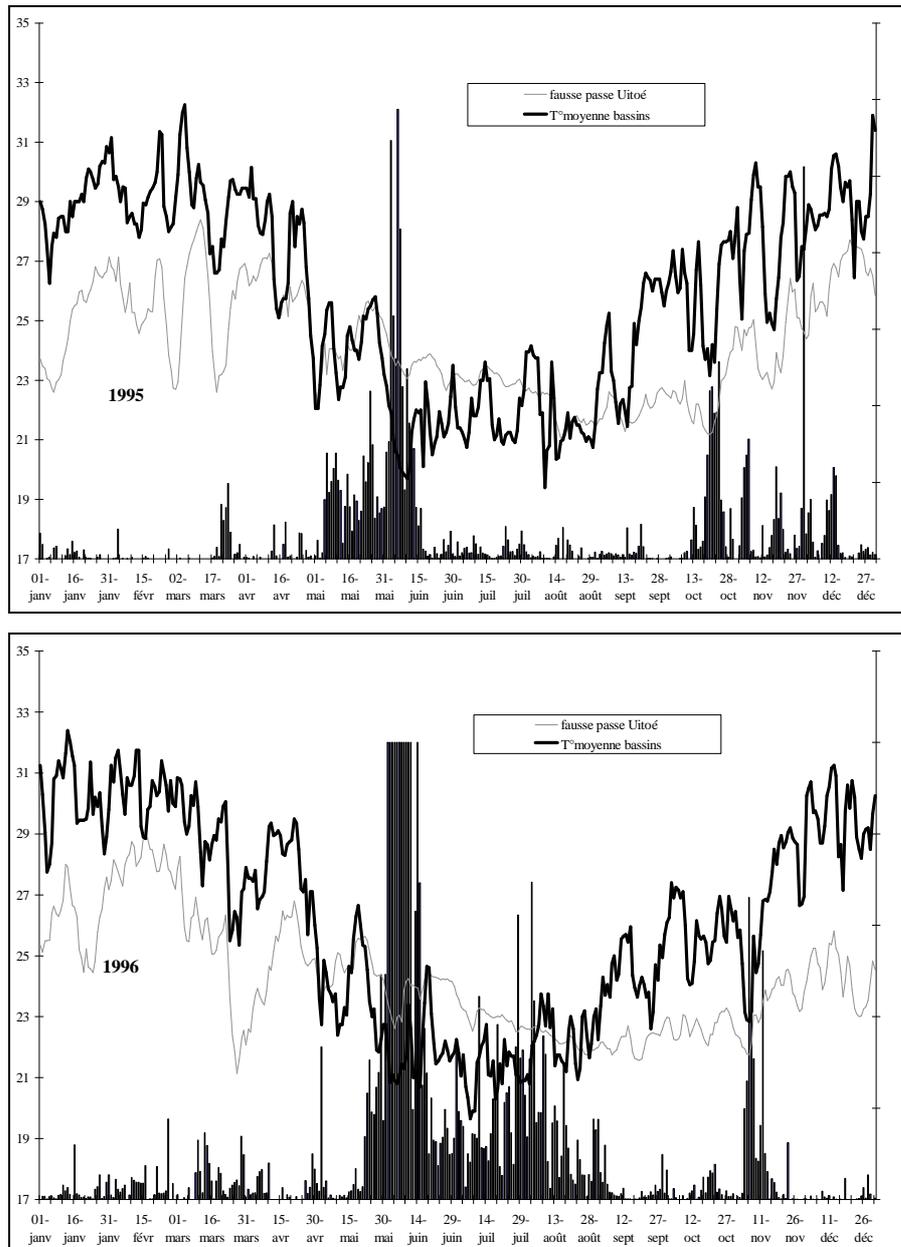
Les crevettes atteintes présentent également fréquemment des signes et lésions typiques d'entérite hémocytaire. Ce type de lésion a été décrit et attribué à la présence dans les enceintes d'élevage de Cyanophycées toxiques par Lightner *et al.* (1978). L'hypothèse du rôle toxique de Cyanophycées benthiques a ainsi été évoqué et étudié. Par la suite, il apparaît évident que la présence de fortes concentrations de Cyanophycées dans le tapis benthique de certains bassins - en effet souvent associée à des lésions d'entérite hémocytaire - constitue un facteur aggravant la sévérité des épisodes morbides, mais que certains bassins qui ne rencontrent pas de problèmes de Cyanophycées dans les tapis benthiques sont quand même affectés par les épisodes de mortalité.

De plus, l'histologie révèle la présence de corpuscules basophiles dans de nombreux organes, évocateurs de pathologies virales (Mermoud *et al.*, 1998) selon certains auteurs.

I.1.4. : Caractère saisonnier du Syndrome 93 et effet de la température

Cette pathologie apparaît rapidement saisonnière (voir graphique 1), puisque les élevages qui se déroulent exclusivement en saison chaude ne sont pas (ou très peu) affectés. Une analyse plus fine des données de suivi des bassins montre que les flambées épizootiques sont observées après des baisses rapides de la température de l'eau des bassins de plusieurs degrés en quelques jours (voir graphique 1 en 2 parties).

Graphique 1 : Températures à l'extérieur du lagon et dans les bassins géniteurs de la SASV, et mortalité relevée dans les élevages.

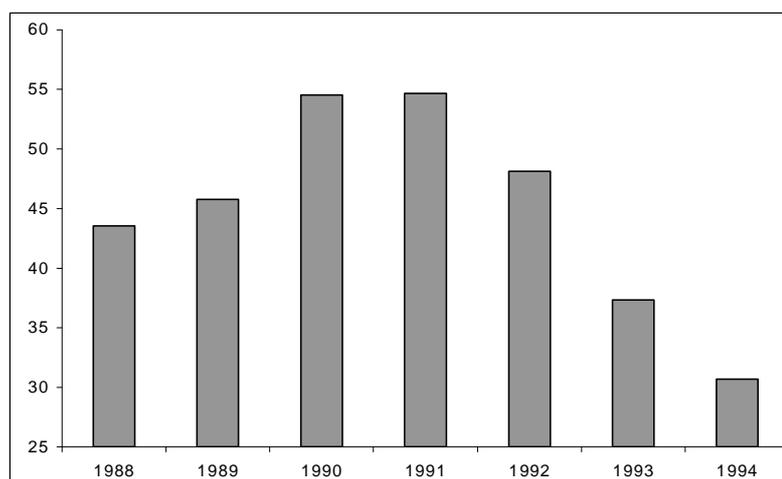


Les températures des bassins présentées ici correspondent à la moyenne de deux relevés quotidiens (environ 7h00 et 14h00) réalisés sur les bassins géniteurs de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent (SASV). Les données de mortalité correspondent aux observations faites sur 4 fermes du Territoire (Aquamer à Moindou, Pénéide de Ouano à La Foa, Webuihoone à Voh, SASV à Boulouparis) à l'occasion de tours quotidiens des bassins de grossissement (données des fermes de grossissement recueillies par L. Della Patrona). Leur valeur n'est qu'indicative, permettant de situer dans le temps les épisodes pathologiques.

I.1.5. : Conséquences biotechniques :

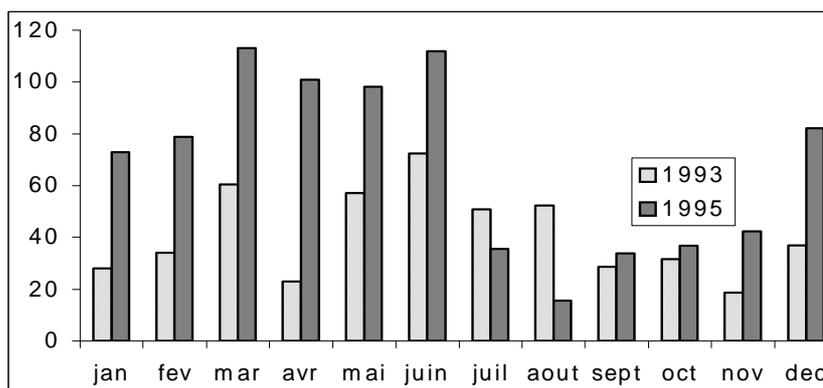
Dans les élevages de grossissement affectés, les survies, jusqu'alors de l'ordre de 45 à 60% tombent à des valeurs de 15 à 25% (voir graphique 2).

Graphique 2 : Survies moyennes annuelles sur les deux fermes de grossissement les plus anciennes de Nouvelle-Calédonie.



La rentabilité des fermes est remise en question par l'émergence de cette pathologie. Les stratégies développées par les aquaculteurs pour tenter de restaurer la rentabilité de leurs exploitations s'orientent d'abord vers la réalisation d'élevage plus courts : L'objectif est alors de réaliser deux cycles complets par an dans chaque bassin. L'élevage « d'été » permet de couvrir les coûts fixes de l'exploitation, malgré la pêche d'animaux de petits calibres, l'élevage d'hiver apportant le complément à l'équilibre des comptes d'exploitation, voire un léger bénéfice. L'activité des fermes de grossissement devient dès lors saisonnière, avec un retentissement tout au long de la filière, depuis les écloséries jusqu'à l'atelier de conditionnement et de commercialisation (voir graphique 3).

Graphique 3 : Tonnages mensuels pêchés au cours des années 1993 et 1995.



Actuellement, cette tendance générale demeure, avec deux variantes, liées à la taille des fermes :

- Les fermes de petite ou de moyenne taille ne réalisent plus qu'un élevage par an,ensemencé aux mois d'août à octobre, qui permettent de réaliser une bonne récolte de crevettes d'un calibre intéressant avant l'arrivée de la saison de transition. Le reste de l'année est mis à profit pour réaliser un assec général de l'exploitation, et pour effectuer les travaux d'entretien nécessaires.
- Les fermes de plus grande taille, contraintes de mieux étaler leur production au cours de l'année réalisent des ensemencement tout au long de l'année, tout en favorisant les élevages réalisés sur la période plus favorable. Ils limitent alors le nombre de bassins et les densités d'ensemencement pour les élevages d'hiver contraints de traverser la saison fraîche défavorable.

I.1.6. : Vers une meilleure planification ? :

Dès les premières descriptions du Syndrome 93, l'impact du phénomène "El niño" sur les paramètres physico-chimiques de l'eau des bassins était évoqué (Goarant *et al.*, 1996). Par la suite, les années "La niña" sont apparues comme des années plus favorables, du fait de températures en moyennes plus élevées dans les bassins d'élevage. L'amélioration constante des modèles de prévision du phénomène d'Oscillation Sud El niño pourrait permettre à moyen terme une planification biotechnique des densités d'ensemencement, dates de pêches, calibres prévus...

I.2. Éléments climatiques liés au déclenchement d'épisodes de mortalité :

La prévision des conditions conduisant aux épisodes de mortalité du Syndrome 93 a toujours été une priorité. Le facteur déclenchant prépondérant de cette pathologie correspond à de fortes chutes de température. En relation avec le Dr Christian Hénin, océanographe au centre IRD de Nouméa, nous avons discuté de la possibilité de prévoir ces chutes brutales de la température des bassins d'aquaculture.

I.2.1 : Matériel et méthodes :

Les températures des bassins correspondent à la moyenne de deux relevés quotidiens (environ 7h00 et 14h00) réalisés sur les bassins géniteurs de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent (SASV). Les températures relevées à la fausse passe de Uitoé correspondent à la moyenne journalière de 96 données (toutes les 15 minutes) enregistrées de façon automatique par un capteur placé depuis 1993 à une profondeur d'environ 10 mètres. Au niveau du Récif du Prony, les données correspondent également à la moyenne journalière de 96 mesures enregistrées depuis janvier 1996. Le même appareillage a été placé au niveau du Cap Goulvain, au Nord de Bourail, à l'extérieur du récif barrière, à une profondeur de 10 mètres en mars 1997. La figure 1 suivante présente la localisation géographique des sites mentionnés.

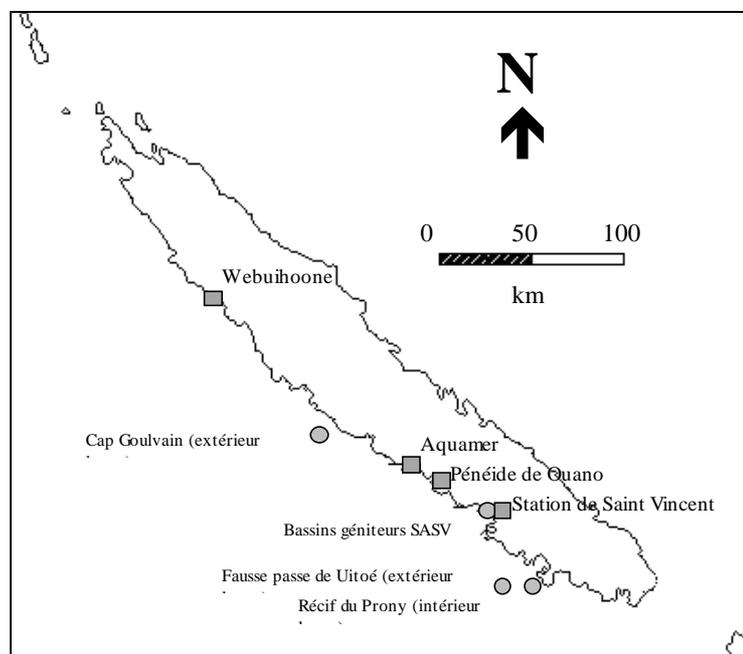


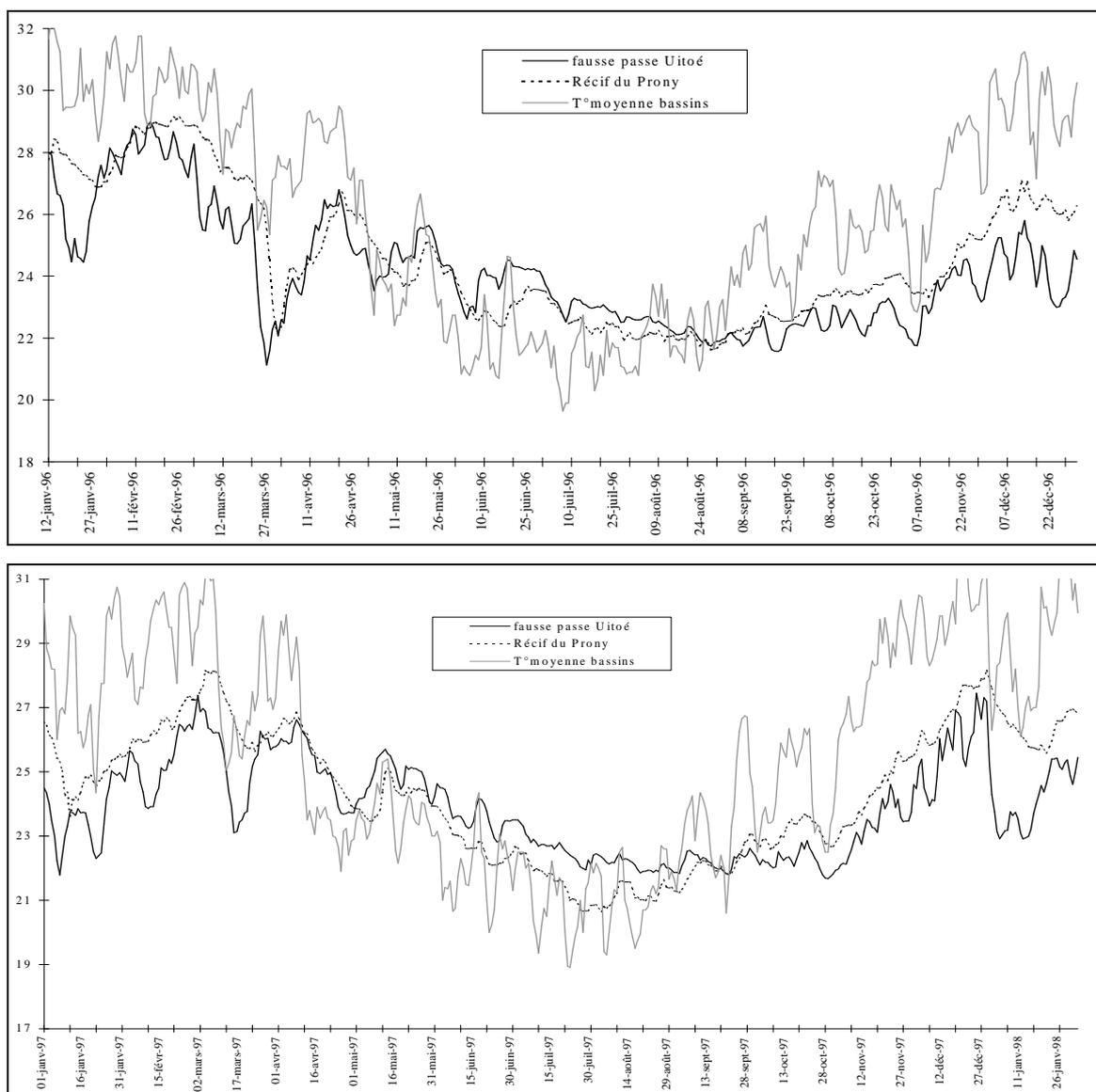
Figure 1: Localisation des sites de mesure et de relevé des mortalité.

I.2.2 : Résultats et discussion :

La comparaison des températures relevées à l'extérieur du lagon (fausse passe de Uitoé), à l'intérieur du lagon (Récif du Prony) et dans les bassins géniteurs de la SASV est présentée pour les années 1996 et 1997 dans les graphique 4 (en 2 parties). Cette comparaison montre :

- que les variations brutales de la température océanique s'accompagnent, avec un léger retard, de variations comparables dans l'eau du lagon,
- que les chutes rapides de température dans les bassins d'élevage sont quasi-synchrones de chutes comparables, quoique de moindre amplitude, observées à l'extérieur du lagon.

Graphique 4 : Températures à l'extérieur du lagon, dans le lagon et dans les bassins d'élevage au cours des années 1996 et 1997.



L'interprétation océanographique de ce phénomène est l'apparition d'un phénomène d'upwelling côtier (Hénin, C. com. pers.), qui est associé à la présence de vents alizés soutenus pendant plusieurs jours. D'autre part, la comparaison des données de températures de l'eau à l'extérieur (fausse passe de Uitoé) et de l'air au phare Amédée (données Météo France non présentées ici) montre que la température de l'air suit de façon très proche la température de l'eau, ce phénomène étant encore accentué par la présence d'alizés soutenus.

La comparaison des températures relevées à l'extérieur du lagon à la fausse passe de Uitoé et au Cap Goulvain montre une forte similitude des variations de celles-ci (données non présentées). Le phénomène d'upwelling côtier semble donc intéresser l'ensemble de la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie.

A l'opposé, la côte Est subit l'influence d'un courant côtier chaud dirigé vers le sud-est. L'alizé, vent prédominant, ne peut selon les lois de l'hydrodynamique engendrer d'upwelling le long de la côte Est. Ainsi peut-on expliquer la présence d'eau de température plus élevée et plus stable le long de la côte Est (Hénin, com. pers.).

Du fait des faibles taux de renouvellement réalisés dans les bassins géniteurs de la SASV (5 à 15 % quotidiens), la chute de température observée dans les bassins ne peut pas correspondre au seul refroidissement lié à l'apport quotidien d'eau plus froide. Il apparaît dès lors que le vent a probablement un rôle prédominant, d'autant plus marqué que ce phénomène est associé à des vents forts, que la température océanique est déterminante sur la température de l'air et que la profondeur des bassins est faible.

Au niveau de la température lagonnaire, il apparaît que celle-ci suit la température observée à l'extérieur du lagon, avec une latence qui pourrait correspondre à la durée de séjour de l'eau dans le lagon (correspondant à un taux de renouvellement de l'eau lagonnaire). Cette observation est particulièrement notable sur les graphiques aux périodes suivantes : fin mars 1996, mars 1997, fin décembre 1997.

I.2.3 : Synthèse et conclusions :

- Les variations de température observées lors d'épisodes du Syndrome 93 sont associées à des variations semblables, quoique de moindre amplitude, observées à l'extérieur du lagon. La température des bassins est donc influencée par la température océanique. Toutefois, ce phénomène semble indirect, et lié au vent. La faible profondeur des bassins ainsi que leur exposition aux vents dominants pourraient donc être considérés comme des facteurs de risque du Syndrome 93.
- D'autre part, la température du lagon suit (avec un léger retard) les variations de la température océanique, ce qui démontre l'entrée de cette eau océanique froide dans le lagon. Cette eau océanique d'origine profonde influence donc les paramètres physico-chimiques de l'eau lagonnaire, donc de l'eau de pompage des fermes aquacoles. Il est possible que les caractéristiques chimiques, voire microbiologiques de cette eau, différentes de l'eau côtière, puissent influencer sur le déclenchement du Syndrome 93, ou sur les événements qui en sont contemporains. L'apport de cette eau d'origine profonde pourrait modifier la composition des populations planctoniques du lagon (phyto- et bactérioplancton) et par ce biais favoriser l'émergence ou la multiplication des germes pathogènes.
- Enfin, l'apparition de ce refroidissement des eaux de surface est lié à la succession de plusieurs jours d'alizé (Hénin, com. pers.), ce qui pourrait constituer un élément prédictif de ces refroidissements. Cette prévision permettrait d'une part, et à court terme, de resserrer les pas d'échantillonnage des suivis de bassins expérimentaux ; d'autre part, et à plus long terme, elle pourrait permettre la mise en œuvre de mesures de gestion zootechnique susceptibles de minimiser l'impact du Syndrome 93 sur les élevages.

I.3. Typage moléculaire de *Vibrio* isolés lors d'épisodes de Syndrome 93

Publication n° 1

I.3.1 : Introduction :

Le typage des microorganismes consiste en une classification des souches en différentes catégories représentant chacune un " type ". Chaque type n'a pas de signification propre, mais les différents types sont comparés entre eux ou à une base de données servant de référentiel. Ces comparaisons servent de base à une interprétation épidémiologique. Différentes méthodes de typage ont été développées pour les microorganismes, basées sur des caractères phénotypiques tels que l'utilisation de certains substrats carbonés ou azotés (biotypie), les propriétés antigéniques (sérotypie), la sensibilité à des bactériophages (lysotypie). Depuis l'essor des techniques moléculaires, de nombreuses méthodes ont été développées à des fins de typage des microorganismes et ont rapidement supplanté les méthodes classiques (Aznar *et al.*, 1993 ; Versalovic *et al.*, 1993 ; Austin *et al.*, 1995 ; Grimont et Grimont, 1996).

Les études concernant les germes marins se heurtent fréquemment aux difficultés d'identification et de caractérisation des bactéries marines à l'aide des outils phénotypiques disponibles (Austin *et al.*, 1995 ; Aznar *et al.*, 1993), souvent inadaptés car destinés à des germes cliniques de médecine humaine. Contrairement à ce qui s'est fait dans l'étude épidémiologique de *Vibrio anguillarum*, pathogène pour les Poissons (Larsen *et al.*, 1994), le sérotypage n'a pas connu chez les *Vibrio* pathogènes en pénéculture de développement majeur, même sur les espèces réputées pathogènes dans toutes les régions productrices, comme *Vibrio harveyi*.

Le typage apparaît pourtant être une approche particulièrement intéressante dans l'étude épidémiologique d'un phénomène pathologique. Dans le cadre du Syndrome 93, où les flambées épizootiques saisonnières synchrones sur des exploitations distantes de plusieurs centaines de kilomètres sont séparées par plusieurs semaines à plusieurs mois sans expression de la maladie, le typage revêtait un intérêt indéniable. De plus, peu d'études sur les *Vibrio* pathogènes des crevettes Pénéides ont, à ce jour, eu recours aux techniques moléculaires, qui se sont pourtant avérées dans nombre d'autres domaines d'excellentes alternatives pour le typage à des fins épidémiologiques.

Deux techniques d'amplification au hasard ont été décrites simultanément en 1990.

La technique d'AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR, Welsh et McClelland, 1990) utilise une amorce assez longue (20 à 35 nucléotides). L'amplification commence avec deux cycles avec une température d'hybridation très inférieure à la température de dissociation. Suivent 35 cycles de forte stringence, garants d'une bonne reproductibilité de la technique. L'amplification intègre des nucléotides radioactifs (^{32}P), les fragments amplifiés sont généralement de petite taille (<500 paires de bases) et révélés par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide, assurant une forte sensibilité.

La technique de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams *et al.*, 1990) utilise des amorces de 10 à 15 nucléotides au cours d'une amplification en stringence moyenne pour tous les cycles. Les fragments amplifiés de 300 à 4 000 paires de bases sont séparés en gel d'agarose, et les profils visualisés en fluorescence après coloration au bromure d'éthidium.

Il faut noter que dans ces deux techniques l'ensemble de l'ADN présent dans l'organisme étudié (chromosome, plasmide, phage...) contribue au profil obtenu (Grimont et Grimont, 1996).

Ces deux techniques présentent l'avantage de ne pas nécessiter de connaissance préalable du génome de l'organisme à étudier. L'AP-PCR a un pouvoir discriminant élevé (Welsh *et al.*, 1992 ; Perolat *et al.*, 1994) permettant souvent des discriminations à un niveau infra spécifique. Elle a été utilisée avec succès pour typer divers genres bactériens (Welsh *et al.*, 1992 ; Perolat *et al.*, 1994 ; Ralph *et al.*, 1993), y compris des espèces du genre *Vibrio* (Martinez *et al.*, 1994).

Notre étude avait pour objectifs :

- * l'étude de la prévalence des différentes espèces bactériennes identifiées, et en particulier la confirmation de la prédominance des deux espèces *Vibrio penaeicida* et *V. nigripulchritudo*.

- * l'étude de la diversité génotypique au sein de ces deux espèces majoritaires.

De cette étude de la diversité génotypique, des éléments épidémiologiques devaient être déduits.

I.3.2 : Matériel et méthodes :

La sélection des souches devait permettre de répondre à ces questions. Il convenait donc d'inclure au moins une souche de référence de chacune des espèces suspectées d'être

impliquées, ainsi qu'un échantillon de souches disponibles représentant les épisodes de mortalité du Syndrome 93.

Les souches suivantes ont été incluses dans l'étude de typage :

* Quatre souches de référence choisies sur la base des travaux précédents (ribotypes et hybridations ADN / ADN à l'Institut Pasteur de Paris, biotypes au LTDV / CIRAD). Ces quatre espèces sont : *Vibrio penaeicida* (KH-1^T = IFO 15640 = JCM 9123, fournie gracieusement par le professeur Muroga, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan) ; *V. nigripulchritudo* (CIP 103195, Collection de l'Institut Pasteur) ; *V. alginolyticus* (CIP103336) et *V. harveyi* (CIP103192).

* Quatre souches de *Vibrio penaeicida* japonais isolées de *Penaeus japonicus* lors d'épisodes de vibriose dans cette espèce au Japon ont également été incluses, souches PO-1, KO-1, PD-A et KT-1 en plus de la souche type KH-1^T. Ces souches ont également été fournies gracieusement par le professeur Muroga.

* Les souches " historiques " du Syndrome 93, déjà documentées, soit par ribotypie soit dans le cadre d'infections expérimentales :

AM-23	octobre 1994
AQ-61	mars 1994
AQ-66	mars 1994
SF-5	janvier 1994
SO-27	octobre 1994
W-1	avril 1994
W-9	avril 1994
W-11	avril 1994
SO-38	mai 1995
SO-65	mai 1995

(où AM, AQ, SF, SO et W désignent des souches provenant respectivement des fermes Aquamer, Aquamon, Sea Farm, Sodacal et Webuihoone)

Enfin une sélection de souches issues de prélèvements monomorphes sur des animaux moribonds au cours de pics de mortalité de la saison froide 1995 sur 4 fermes du Territoire constituaient la plus grande part des souches étudiées. Ces souches étaient conservées congelées au Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire qui les a mises à notre disposition. Cette sélection de souches est présentée dans le tableau 1, qui précise leur origine (ferme et date de l'épisode de mortalité). L'origine des postlarves ayant servi à ensemercer les

bassins où ont eu lieu ces épisodes de mortalité y est également précisée. La localisation géographique des fermes et écloseries citées dans ce tableau ou dans le texte est précisée sur la carte en annexe.

Tableau 1 : Origine des souches sélectionnées pour le typage moléculaire.

Ferme, bassin et date de prélèvement de souches isolées lors d'épisodes de Syndrome 93 au cours de la saison fraîche 1995, et origine des postlarves ayant servi à l'ensemencement de ces bassins.

Sea Farm, 2 (mars 95)	FAO, K (mai 95)	Aquamer, G (mai 95)	Aquamon, A (juin 95)
SF-100	F-1	AM-101	AQ-102
SF-101	F-2	AM-102	AQ-103
SF-113	F-5	AM-107	AQ-104
SF-116	F-6	AM-108	AQ-105
SF-121	F-11	AM-109	AQ-106
SF-122	F-14	AM-111	AQ-107
SF-125	F-15	AM-112	AQ-109
SF-126	F-24	AM-113	AQ-110
SF-127	F-25	AM-114	AQ-111
SF-140		AM-115	AQ-112
SF-143		AM-116	AQ-113
			AQ-114

Origine des postlarvesensemencées dans ces bassins (écloserie et n° de nursery)

Écl. Montagnès M 102	Écl. Montagnès M 100 & M 101	Écloserie de Mara	Écl. Montagnès M 99 & M 100

Les ADN ont été extraits au phénol chloroforme selon la technique décrite par Brenner *et al.* (1982), ainsi qu'avec une technique plus rapide décrite par Boom *et al.* (1990). La technique de typage utilisée est celle de l'AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, Welsh et McClelland, 1990) qui permet, à l'aide d'amorces arbitraires, de générer des profils électrophorétiques qui peuvent être utilisés pour comparer les micro-organismes au niveau de l'espèce ou au sein de la même espèce.

Technique : amplification à l'aide d'amorces arbitraires, dans 50 µl de milieu réactionnel, à travers deux cycles en faible stringence (annealing de 5 minutes à 40 °C), puis 35 cycles de plus forte stringence (annealing d'une minute à 60 °C). Les ADN amplifiés récupérés sont mis à migrer à froid (en gels d'agarose, révélés au Bromure d'Ethydium sur table UV) puis, pour plus de sensibilité et de précision, à chaud (en gels de polyacrylamide révélés par autoradiographie suite à un marquage au [³²P] dCTP de l'ADN amplifié).

Sept de ces amorces arbitraires ont été testées dans un premier temps (à froid) KF, KN, RSP, KZ, KpnR, KG et SP. Le détail des conditions de PCR ainsi que les séquences des amorces utilisées sont données dans l'annexe technique.

I.3.3 : Résultats :

Choix des amorces :

Trois amorces ont été conservées pour l'étude à chaud : RSP et SP du fait des profils électrophorétiques riches qu'ils généraient, présageant un fort caractère discriminant et KF qui permettait, déjà lors des électrophorèses à froid, de différencier des sous-groupes au sein de l'espèce *Vibrio penaeicida*. La figure 2 présente l'autoradiogramme des profils électrophorétiques obtenus sur les souches de *V. penaeicida* avec l'amorce SP.

Identification des espèces :

L'identification des espèces est permise par chacune des trois amorces sélectionnées lorsque la souche de référence de l'espèce correspondante est incluse dans l'étude. Ainsi :

* trois isolats : AQ 114, W 9 et W 1 n'ont pas été identifié,

* trois isolats : AQ 61, AQ 66 et SF 5 correspondent à *V. alginolyticus*,

* deux isolats : AQ 113 et W 11 correspondent à *V. harveyi*,

* sept isolats : AM 102, AM 109, AM 114, AM 115, SO 27, SO 38 et SO 65 correspondent à *V. nigripulchritudo*,

* enfin, les 42 autres isolats correspondent à *V. penaeicida*.

Résultats d'intérêt épidémiologique et discussion :

* Les *V. penaeicida* japonais peuvent être différenciés des Néo-calédoniens avec chacune des trois amorces. Ces différences portent sur des fragments nombreux et stables entre les différents isolats de chacun des deux groupes nationaux. Ceci ne permet pas de prouver

formellement que les *Vibrio penaeicida* de Nouvelle-Calédonie ne proviennent pas d'une importation, mais rendent cette hypothèse peu probable.

* Tous les isolats (43) provenant des 4 pics de mortalité de 1995 ont été identifiés à *V. penaeicida* ou à *V. nigripulchritudo*, à l'exception des souches AQ-114 non identifiée, et AQ-113 identifiée à *V. harveyi*. Cette observation confirme le rôle majeur de *Vibrio penaeicida* et de *V. nigripulchritudo* dans la pathogénie du Syndrome 93.

* Toutes les souches identifiées à *V. nigripulchritudo* proviennent de Sodacal ou d'Aquamer. Vu le nombre important de souches étudiées par ailleurs, il est fort probable que les *Vibrio nigripulchritudo* pathogènes sont absents des autres sites étudiés, du moins au moment des prélèvements étudiés ici. Dans l'hypothèse où cette dissémination n'aurait toujours pas eu lieu, des mesures zootechniques devraient être prises, dont certaines seront exposées plus bas au paragraphe I.3.4.

* Il a également été possible de différencier des sous-groupes au sein des *V. penaeicida* Néocalédoniens. Les sous-groupes sont présentés dans le dendrogramme suivant en figure 3 résumant les résultats (où les distances représentées ne correspondent pas à des distances génétiques).

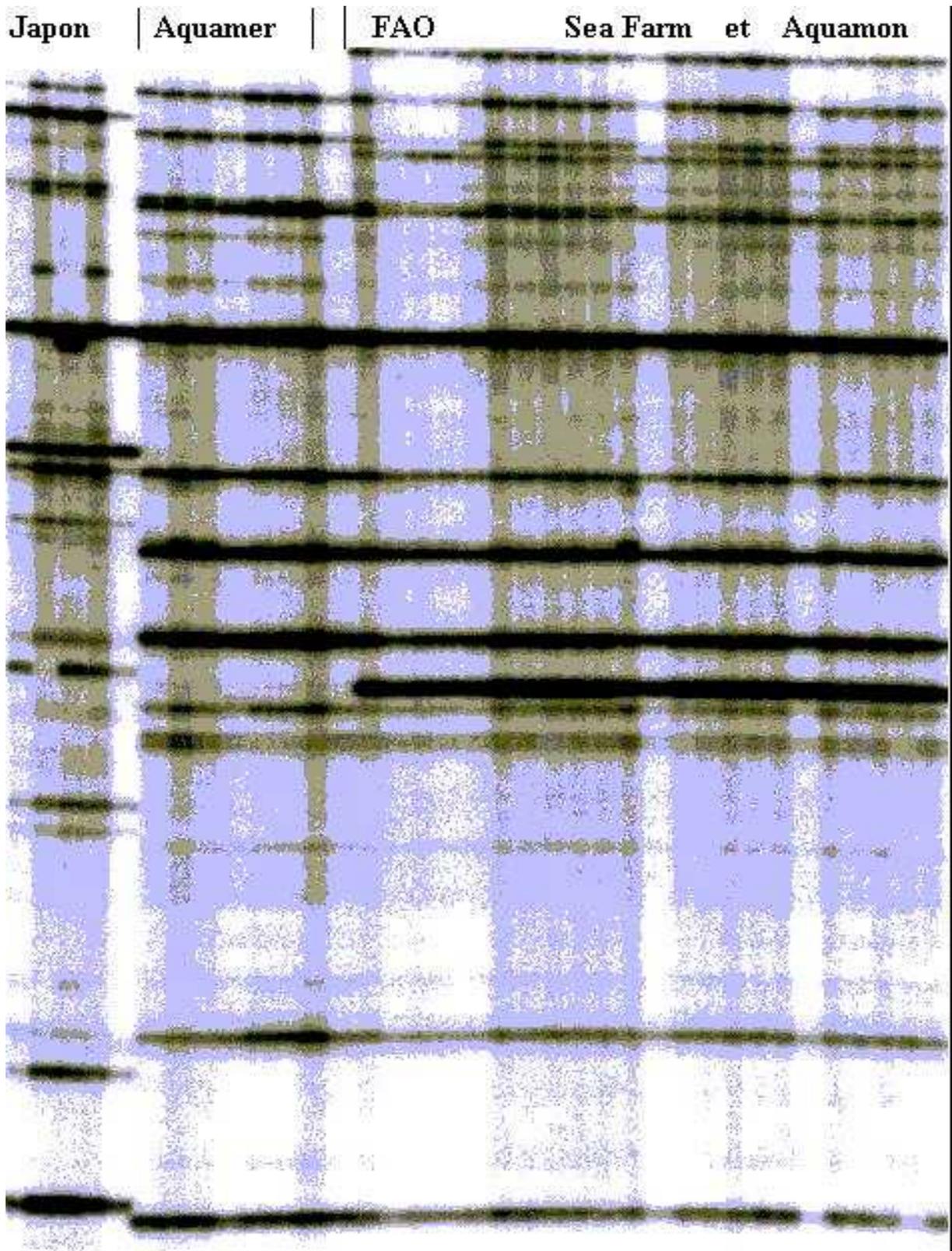


Figure 2 : Autoradiogramme des profils électrophorétiques obtenus avec l'amorce SP.

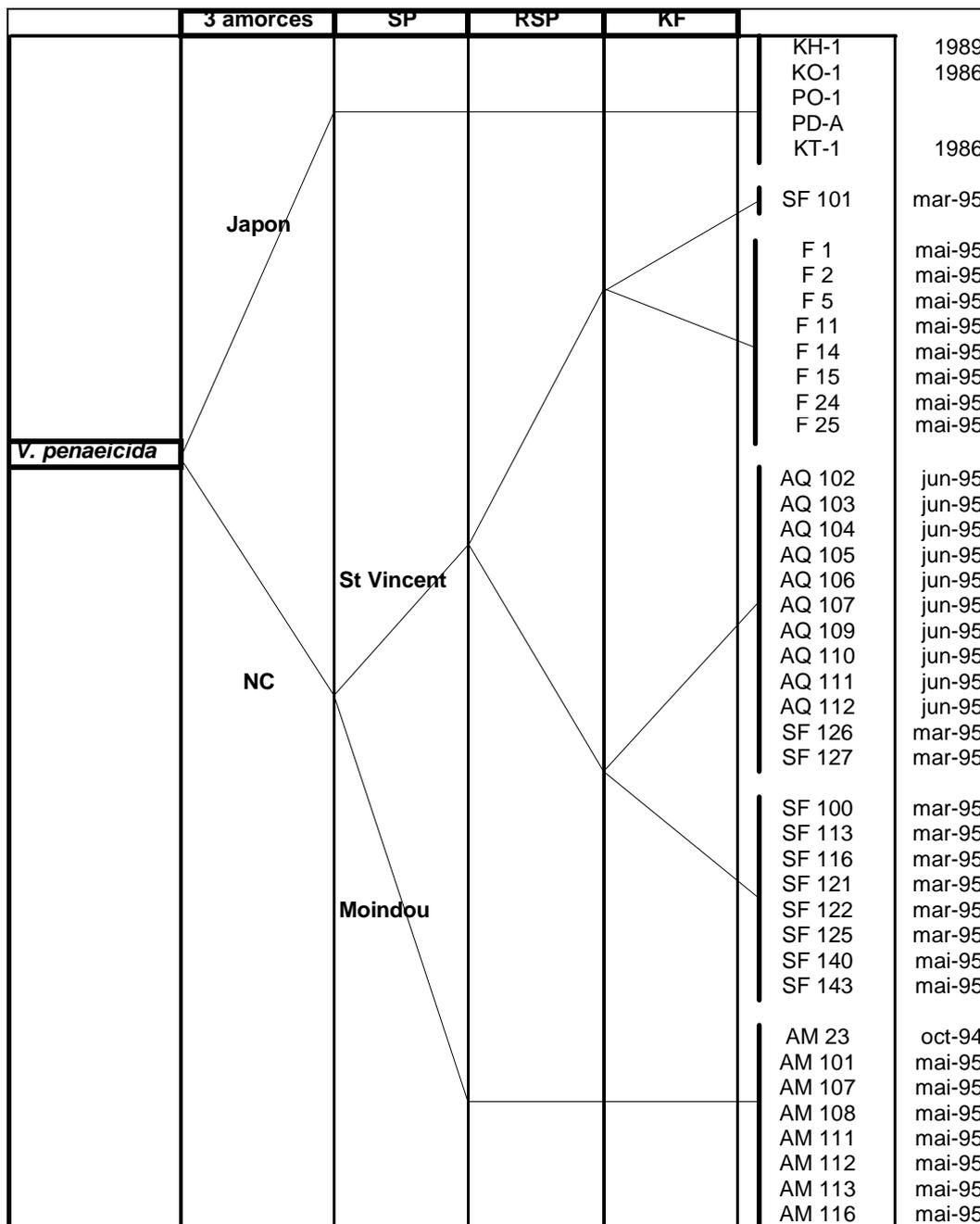


Figure 3 : Dendrogramme des types déduits des profils électrophorétiques en AP-PCR.

I.3.4 : Discussion :

L'analyse des sous-groupes ainsi différenciés permet de montrer :

* La distinction majeure entre les isolats japonais et les isolats de Nouvelle-Calédonie déjà signalée et discutée ci-dessus.

* La distinction de deux sous-groupes géographiques correspondant d'une part aux isolats de la ferme Aquamer (groupe « Moindou »), d'autre part aux isolats des trois autres fermes, toutes trois situées en baie de Saint-Vincent (groupe « Saint-Vincent »).

* La stabilité temporelle du groupe « Moindou », puisque la souche AM-23, prélevée en octobre 1994, apparaît identique aux autres souches prélevées en mai 1995).

* Au sein du sous-groupe « Saint-Vincent », des géotypes communs à deux fermes (Aquamon et Sea Farm), prouvent une relative communauté de pathogènes entre ces deux fermes situées aux deux extrémités de la baie.

L'origine des postlarves des bassinsensemencés (voir plus haut, Matériel et méthodes) laisse demeurer l'hypothèse que ces types correspondent à l'écloserie d'origine. La figure 4 ci-après présente la répartition des types de *V. penaeicida* qui auraient dû être observés dans le cas où les postlarves seraient à l'origine de la contamination des bassins de grossissement. La comparaison du dendrogramme présenté en figure 3 avec l'origine précise des lots de postlarves infirme cette hypothèse (comparaison figure 4 ci-après), ce qui prouve que ces postlarves ne sont pas à l'origine de la contamination des bassins. Il apparaît donc que la source commune de contamination par *Vibrio penaeicida* est très vraisemblablement l'eau de pompage.

Le statut des autres fermes de grossissement du Territoire n'est pas connu en terme de présence et de variabilité génétique des *Vibrio* pathogènes étudiés. La répartition spatiale des deux espèces majoritaires étudiées devrait être précisée, en particulier la présence ou l'absence de *V. nigripulchritudo* sur les autres sites (Webuihoone, Blue Lagoon Farms, Pénéide de Ouano, Bassins de Dumbéa), mais aussi sur les lots de géniteurs des écloseries.

Il conviendrait en particulier d'évaluer rapidement les risques de dissémination de *V. nigripulchritudo* à partir des fermes où sa présence a été montrée. La mesure prioritaire à mettre en œuvre semble être de proscrire les échanges d'animaux juvéniles ou adultes (notamment géniteurs) entre fermes ou écloseries. En cas d'absolue nécessité, ces échanges pourraient avoir lieu, s'ils étaient précédés d'une antibiothérapie ciblée et dont l'efficacité devrait être montrée par des analyses de sensibilité des souches bactériennes présentes.

Les échanges de postlarves ne semblent pas avoir été jusqu'au moment de l'étude la cause d'une dissémination des deux espèces pathogènes majeures. Aucune mesure stricte ne peut donc être donnée à cet égard, mais la prudence serait préférable : les échanges de postlarves entre écloseries et fermes de baies différentes semblent donc déconseillés.

Enfin, concernant *V. penaeicida*, les travaux japonais (De la Peña *et al.*, 1995) confirmés par nos travaux sur les souches calédoniennes montrent une survie de *V. penaeicida* en eau de mer très longue (supérieure à 12 mois pour les travaux japonais, au moins égale à 14 mois pour les travaux de la SASV)... Cette conclusion, ainsi que celles de cette étude font de la vibriose à *V. penaeicida* une pathologie contagieuse véhiculée par l'eau, et installée de façon enzootique sur les sites où se trouve le pathogène. Les moyens de lutte zoosanitaire apparaissent dès lors très limités.

Par rapport aux travaux précédents réalisés en phénotypie, ribotypie et en hybridation ADN / ADN (Costa *et al.*, 1998b), notre étude est en accord sur les résultats d'identification des espèces, mais elle offre un niveau de discrimination plus élevé. La démarche adoptée ici (où 43 des 61 souches étudiées n'ont été choisies que sur la base de leur implication dans le phénomène morbide) amène à distinguer plusieurs étapes dans le travail effectué : après une étape d'identification en terme d'espèce (effectuée au cours de la présélection des amorces à froid), l'étude des groupes majoritaires à chaud permet le typage *sensu stricto* nécessaire à l'aspect épidémiologique de l'étude. Cette démarche nécessite d'intégrer dans l'étude les espèces de référence adéquates à titre de comparaison, condition indispensable à l'identification des isolats de terrain. Elle a été permise par l'identification des espèces majoritaires au cours de travaux précédents. En effet, aucune base de données ne peut être consultée pour comparer les profils électrophorétiques en AP-PCR à ceux de souches de référence, alors qu'une telle base existe pour les ribotypes des *Vibrio spp.* à l'Institut Pasteur de Paris. Cette démarche apparaît donc intéressante, permettant dans un temps limité d'effectuer une étude relativement poussée d'un phénomène, d'identification puis de typage en un nombre limité d'étapes.

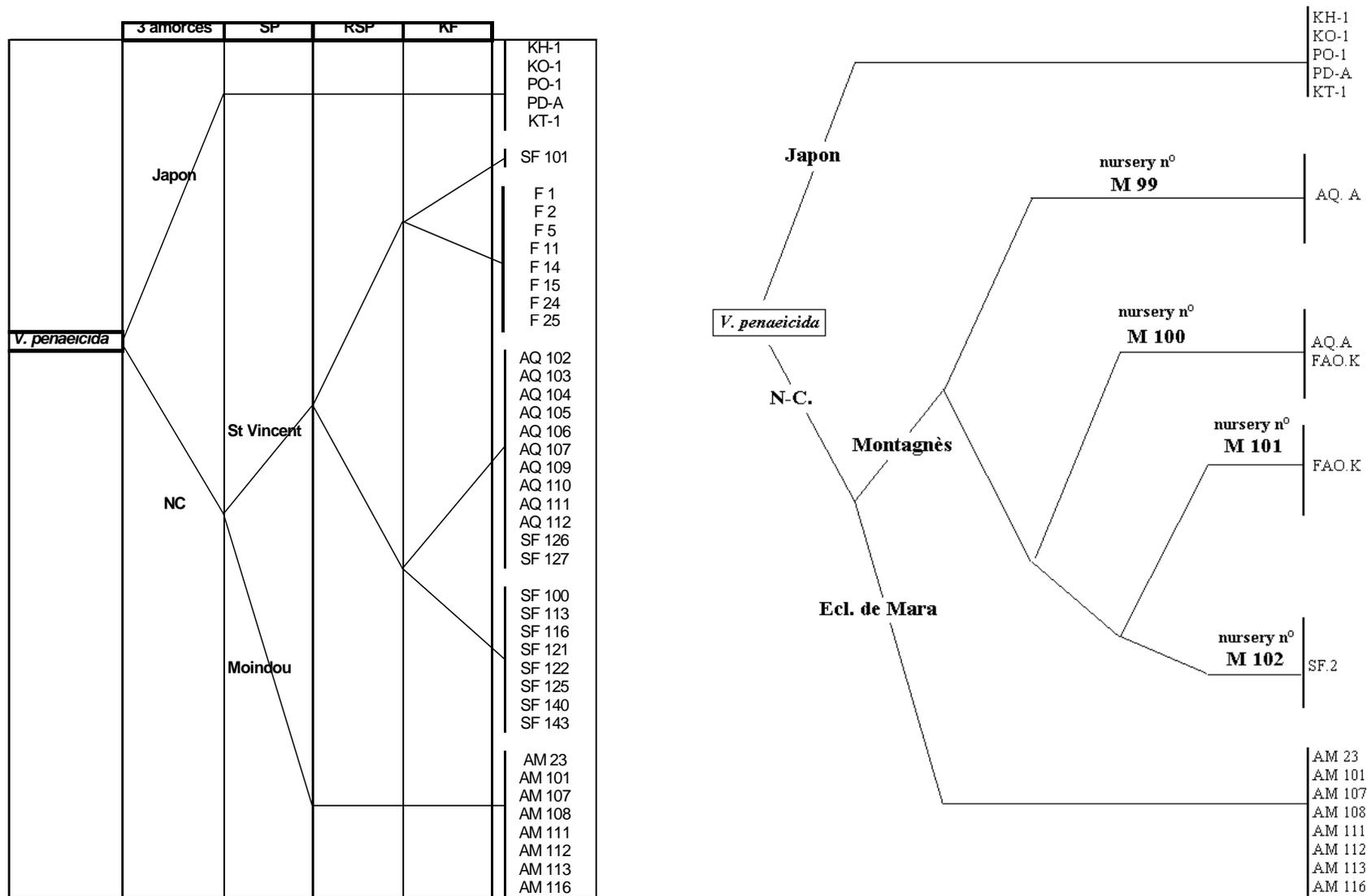


Figure 4 : Comparaison entre le dendrogramme obtenu par l'étude de typage et un dendrogramme hypothétique correspondant au cas où les postlarves seraient à l'origine de la contamination des bassins.

I.4. Suivi épidémiologique de *Vibrio penaeicida* dans les différents compartiments de l'élevage de crevettes par amplification génique

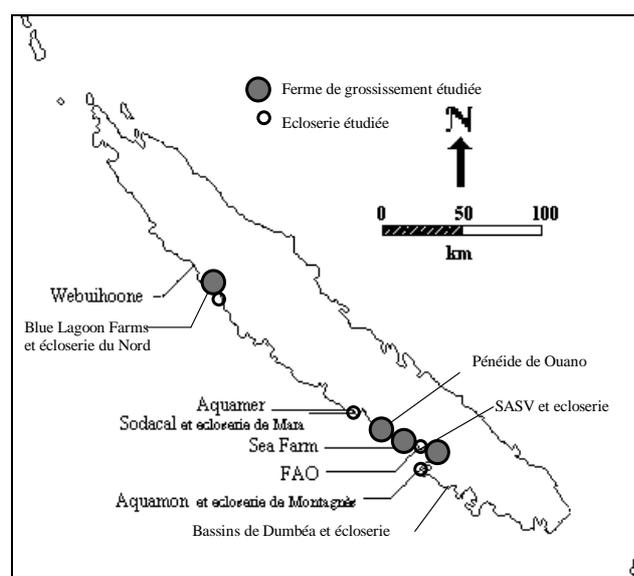
Le Syndrome 93 a un caractère saisonnier marqué, rendant la rentabilité des élevages hivernaux très aléatoire. *Vibrio penaeicida* est considéré comme l'agent étiologique majeur du Syndrome 93, comme l'a montré l'étude présentée précédemment. Une suivi épidémiologique vaste de ce pathogène, concernant les différents compartiments de l'élevage et les différents stades de développement des crevettes, s'est avéré nécessaire à la meilleure compréhension du phénomène. Cette étude, du fait du caractère saisonnier de la maladie, a été entreprise sur une année complète. Elle a débuté en 1998 et s'est poursuivie sur 2 élevages de chacun des bassins étudiés.

La connaissance du mode de transmission de *Vibrio penaeicida* et de sa dynamique dans les différents compartiments des élevages pourrait en effet permettre la mise en œuvre de moyens de prévention ou de lutte permettant de limiter l'impact du Syndrome 93 dans les élevages hivernaux, voire la mise en place d'un plan de gestion zoonitaire.

I.4.1 : Matériel et méthodes :

L'étude porte sur quatre bassins localisés dans des fermes réparties le long de la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie, ainsi que sur les quatre écloséries en activité. La figure 5 suivante présente la localisation géographique des sites étudiés.

Figure 5 : Localisation des sites étudiés.



Tous les compartiments pouvant jouer un rôle de réservoir ou de vecteur de l'agent pathogène, ainsi que l'hôte à divers stades de développement sont étudiés :

- L'eau de pompage, l'eau des bassins, 30 ml sont centrifugés pendant 15 minutes à 5 000 g. L'extraction des acides nucléiques (méthode du Chelex, voir annexe) est réalisée sur 10 microlitres du culot de centrifugation obtenu.
- Le sédiment des fonds de bassins en cours d'élevage, en début et en fin d'assec est prélevé par carottage au niveau du moine de sortie. Il est placé dans un tube de verre stérile, fortement mélangé au vortex, puis laissé 15 minutes environ à décanter. Dix microlitres de surnageant sont utilisés pour l'extraction des acides nucléiques.
- Les animaux tout au long du cycle d'élevage sont étudiés selon leur taille : Les larves, postlarves et les animaux de taille inférieure à 2 g sont étudiés par extraction des acides nucléiques depuis 10 microlitres d'un broyat d'environ 100 individus pour les larves au stade Nauplius à 10 individus pour les juvéniles proches de 2 g de poids individuel. A partir du poids moyen de 2 grammes, dix crevettes présumées saines (ne montrant aucun signe de faiblesse) sont prélevées à l'épervier au niveau du moine de sortie deux fois par mois. L'hémolymphe est ponctionnée dans le sinus ventral et mélangée à un volume équivalent de solution anticoagulante (voir annexe). Ce prélèvement est conservé sur glace jusqu'au laboratoire où 10 microlitres sont utilisés pour l'extraction des acides nucléiques.

L'étude des différents compartiments utilise la technique de l'amplification génique à l'aide d'un oligonucléotide dirigé contre une séquence de l'ADNr de *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000). Les détails du protocole (cycles, volume réactionnel...) de PCR sont précisés en annexe. Les réponses attendues sont de type qualitatif : " présence " ou " absence " de *Vibrio penaeicida*. Le résultat négatif (« absence ») correspond soit à une absence du pathogène, soit à une présence en très faible quantité (correspondant à la limite de sensibilité du test).

Les paramètres physico-chimiques matinaux (température, salinité, oxygène dissous) des bassins suivis et les éléments zootechniques (densité d'ensemencement, dates et importance des mortalités, vitesses de croissance, taux de renouvellement journalier, évolution de la survie) nécessaires à l'interprétation des résultats sont mis à disposition par les fermes concernées.

La flore hétérotrophe totale est évaluée par étalement de 100 µl d'une dilution *ad hoc* sur milieu de ZoBell (voir annexe) de l'eau d'adduction et des bassins étudiés au cours de chaque prélèvement (lecture après une semaine d'incubation à 30°C). La flore présomptive *Vibrionaceae* est évaluée avec la même fréquence par étalement de 100 µl d'eau d'adduction et

des bassins sur une boîte de TCBS (voir annexe) (lecture après 24 heures d'incubation à 30°C, Moriarty, 1998).

I.4.2 : Résultats et discussion : exemple du suivi d'un bassin

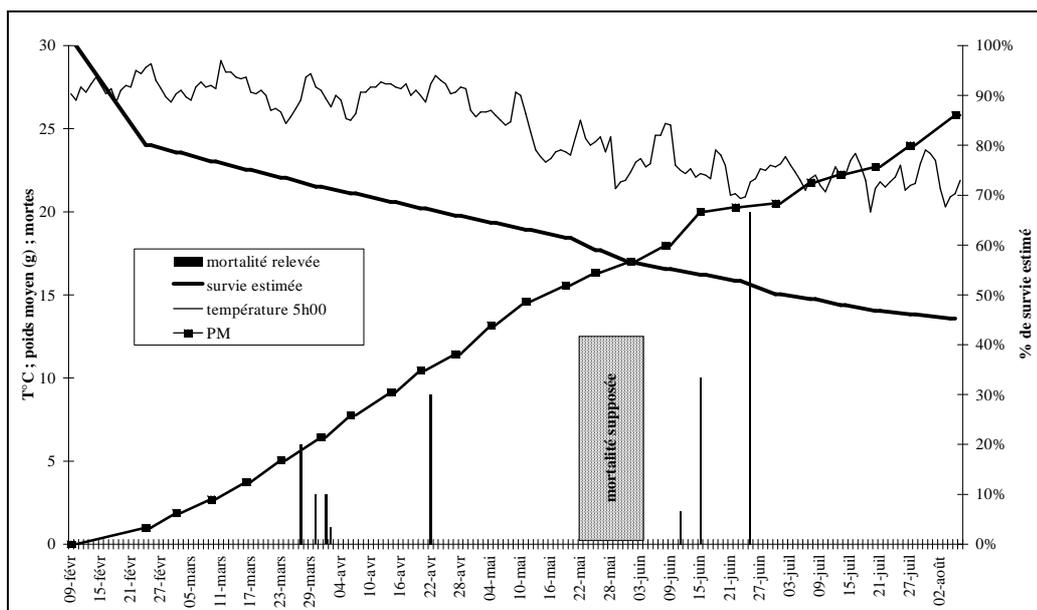
La ferme aquacole Blue Lagoon Farms est située sur la commune de Koné, au bord de la plage de Foué. Cette ferme de 83 ha comporte 21 bassins électrifiés pour l'aération. Sa première mise en eau date du mois d'août 1996. Pour des raisons indépendantes du Syndrome 93, les premiers élevages menés sur cette ferme n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Cette ferme est actionnaire de l'écloserie du Nord, également située sur le site de la plage de Foué, et y achète la quasi totalité des postlarves nécessaires à ses ensemencements. En préalable à ce suivi épidémiologique, la présence de *Vibrio penaeicida* sur ce site a été confirmée par des prélèvements réalisés sur des géniteurs de l'écloserie du Nord.

Le bassin suivi, d'une surface de 3,9 ha a étéensemencé le 9 février 1998 avec 790 000 postlarves produites à l'écloserie du Nord, correspondant à une densité de 20 PL / m². Ce bassin avait subi un assec de 24 jours au cours duquel 100% de la surface avait pu être labourée, malgré la présence d'humidité sur environ 20% de la surface du bassin, en bordure de digues. La mise en eau a eu lieu 10 jours avant l'ensemencement. Le bassin a été fertilisé au cours de la phase 0-1 gramme. Deux puis trois aérateurs de 3 chevaux ont été utilisés au cours de l'élevage. Le bassin a été pêché en 3 pêches, les 18 juin, 15-16 juillet et la pêche finale a eu lieu le 5-6 août 1998. L'élevage a duré 184 jours.

Aucun épisode de mortalité ne nous a été signalé au cours de l'élevage. De fait, la mortalité n'a pas pris de forme épizootique sur ce bassin et le nombre de crevettes moribondes trouvées au bord ou sur les mailles du moine de sortie a toujours été limité. Le graphique 5 ci-dessous présente la température, la mortalité observée et la survie estimée (communiquées par Blue Lagoon Farms). Une mortalité anormale a été supposée par l'éleveur sur la période du 19 mai au 1er juin, qui est également présentée sur ce graphique (la survie estimée passe de 61% à 56%). La concordance entre les épisodes de mortalité et des chutes rapides de température permet d'attribuer *a priori* cette mortalité au Syndrome 93, bien qu'aucune crevette moribonde n'ait pu être étudiée.

La pêche du bassin s'est effectuée en 3 fois. La survie finale est de 45,3 % pour un poids moyen pondéré de 24,2 grammes et un indice de conversion (rapport du poids de l'aliment distribué au poids de crevettes produit) de 2,98. Cet indice relativement élevé indique probablement qu'une mortalité a eu lieu au delà d'1 à 2 grammes de poids moyen.

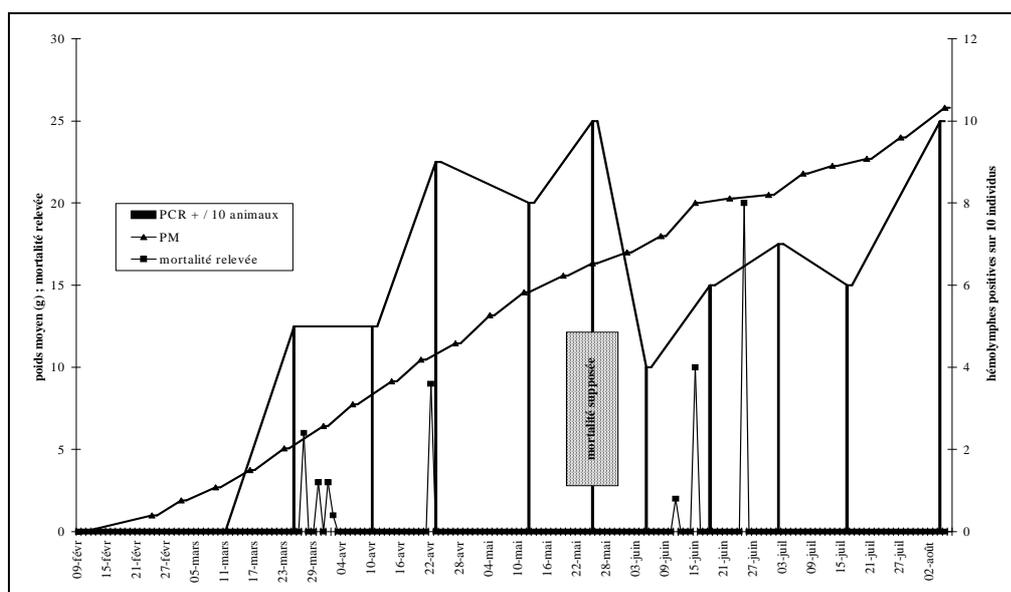
Graphique 5 : Données zotechniques relatives à l'élevage dans lequel s'est effectué le suivi épidémiologique de *V. penaeicida*.



Les résultats des amplifications géniques sur les hémolymphe des crevettes présumées saines sont présentés dans le graphique 6 ci-dessous. Une forte proportion d'animaux porteurs de *Vibrio penaeicida* est détectée dès la fin du mois de mars.

Ces résultats suggèrent que la mortalité discrète qui a affecté ce bassin à plusieurs occasions est due à *Vibrio penaeicida*. Malgré une incidence parfois élevée de porteurs de ce pathogène, la survie finale de ce bassin est de 45 %, ce qui démontre l'existence de porteurs sains de *Vibrio penaeicida* soulignant l'importance des facteurs déclenchant la mortalité.

Graphique 6 : Évolution de la prévalence de *V. penaeicida* et mortalité dans l'élevage suivi.



Au niveau des eaux de pompage et du bassin, *V. penaeicida* est détecté plusieurs fois au cours de l'élevage. Ainsi, les 9 et 24 février, 23 avril et 16 juillet, il est détecté dans l'eau de pompage. Il est de même détecté dans l'eau du bassin les 9 février, 25 mars, 10 avril, 5 juin, 2 et 16 juillet. Aucune relation avec la prévalence d'individus porteurs, avec la flore bactérienne, ou avec les variations de température n'a pu être mise en évidence.

I.4.3 : Synthèse et conclusions :

Ce suivi de *Vibrio penaeicida* dans les animaux et les compartiments de l'élevage sur le bassin 3 de la ferme Blue Lagoon Farms permet de montrer :

- La présence d'animaux porteurs sains, puisque la prévalence atteint 10 animaux sur 10 étudiés. Or, la survie finale de 45% montre qu'une grande partie de ces animaux porteurs a survécu sans exprimer la maladie. Cet aspect souligne une fois encore l'importance que doivent revêtir les facteurs déclenchant la maladie, et l'importance d'apporter un confort optimal à l'animal en élevage, afin de maintenir cet équilibre entre l'agent pathogène et son hôte.
- La présence relativement fréquente de *V. penaeicida* dans l'eau de pompage, faisant de ce compartiment une voie d'entrée du pathogène dans l'élevage probablement importante.
- La comparaison des prévalences de *Vibrio penaeicida* dans les hémolymphes des crevettes de ce bassin avec celles observées dans les hémolymphes des crevettes d'un autre bassin étudié permet de constater que pour ces deux bassinsensemencés presque simultanément, l'évolution

des prévalences est comparable. La contamination des crevettes pourrait avoir été simultanée dans ces deux bassins dans la période entre le 18 et le 25 mars. On note au cours de cette période une chute de température marquée dans ces deux bassins. Cette chute de température dans les bassins pourrait coïncider avec une augmentation ponctuelle des concentrations ou de la virulence de *Vibrio penaeicida* dans l'eau des bassins. La présence de *V. penaeicida* est d'ailleurs montrée dans le prélèvement d'eau du bassin du 25 mars. Cette hypothèse demeure à confirmer ou infirmer par les résultats de suivis des autres élevages.

- Au niveau des pratiques zootechniques, il est intéressant de noter que la survie obtenue sur ce bassin est bonne malgré une saison d'ensemencement défavorable. Cette bonne survie peut être expliquée par deux éléments, qui sont d'une part la clémence de la saison froide 1998, d'autre part, et de façon intéressante, la densité d'ensemencement modérée pour un bassin aéré (20 PL/m²). Quatre élevages de Blue Lagoon Farms ensemencés début février et pêchés entre juillet et août ont donné des survies équivalentes, tous les quatre avaient été ensemencés à des densités considérées comme modérées pour des bassins aérés (2 bassins à 20 PL/m² ; 2 bassins à 25 PL/m²).

Chapitre II : Facteurs de virulence des *Vibrio* responsables de mortalité de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie

Les pathologies attribuées à des bactéries du genre *Vibrio* sont des maladies majeures en aquaculture marine. Ce type de pathologie est rencontré chez toutes les espèces marines élevées. La “ maladie de l’anneau brun ” de la Palourde, la “ vibriose d’eau froide ” chez les Salmonidés et d’autres poissons d’élevage, les nombreuses vibrioses des stades larvaires ou adultes chez les crevettes Pénéides en sont quelques exemples. Les facteurs de virulence ou de pathogénicité des *Vibrio* ont été bien étudiés chez certaines espèces, notamment celles qui présentent un caractère anthroozoonotique tels que *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ou *V. damsela* mais aussi chez des espèces dont le pouvoir pathogène est limité à des espèces aquacoles. Ainsi chez *V. salmonicida* responsable de la “ vibriose d’eau froide ” (Wiik *et al.*, 1989), chez *V. tapetis* (ou “ *Vibrio* P1 ”) responsable de la “ maladie de l’anneau brun ” (Borrego *et al.*, 1996). C’est chez *V. anguillarum* espèce dont de nombreuses souches sont pathogène pour les poissons que le plus grand nombre de travaux ont été menés. Ainsi, des facteurs cytotoxiques (Krovacek *et al.*, 1987) et hémolytiques (Toranzo *et al.*, 1983 ; Kodama *et al.*, 1984) ont été mis en évidence, des systèmes de transport du fer (Köster *et al.*, 1991 ; Conchas *et al.*, 1991). De plus, il a été mis en évidence chez cette espèce que de nombreux gènes liés à la virulence avaient un support plasmidique (Crosa *et al.*, 1977 et 1980). Par la suite, ce “ plasmide de virulence ” a été caractérisé, baptisé “ pJM1 ” et largement étudié comme traceur épidémiologique (Olsen et Larsen, 1990 ; Pedersen et Larsen, 1995 ; Giles *et al.*, 1995...).

À l’opposé, ce n’est que très récemment que quelques travaux ont été publiés concernant les facteurs de virulence ou de pathogénicité de *Vibrio* impliqués dans des pathologies de crevettes (Lee *et al.*, 1997 et 1999 ; Liu et Lee, 1999).

La connaissance des facteurs de virulence de ces *Vibrio* et de leur support moléculaire est pourtant de première importance, puisqu’elle pourra apporter des éléments déterminants à des domaines aussi variés que la mise au point d’outils diagnostiques, les études épidémiologiques et la sélection génétique d’animaux résistants.

II.1. Virulence de *Vibrio penaeicida* en fonction du stade de développement de *Litopenaeus stylirostris*

Publication n°2

Les vibrioses constituent une cause majeure de mortalité dans les élevages aquacoles, et notamment en élevage de crevettes Pénéides. Ce type de pathologie atteint aussi bien les élevages larvaires que les élevages de grossissement (Lightner, 1988 a). Néanmoins, les souches impliquées dans les vibrioses larvaires et celles responsables des vibrioses chez les animaux en grossissement, même quand elles appartiennent à la même espèce, sont rarement identiques. Ainsi, Mohny *et al.* (1994), comparant des souches de *Vibrio harveyi* responsables de vibrioses larvaires et de grossissement de *Litopenaeus vannamei* en Équateur constatent que ces souches sont différentes. De même, en Nouvelle-Calédonie, *Vibrio penaeicida*, responsable du Syndrome 93, affecte les élevages de crevettes au cours de la phase de grossissement mais n'a jamais été impliqué dans des événements pathologiques touchant les phases d'élevage larvaire et d'acclimatation. Il semble donc probable que la sensibilité aux agents étiologiques du Syndrome 93 n'apparaît qu'après un certain temps d'élevage, ou à un certain stade de développement (anatomique, physiologique...) de l'animal. Il nous a donc semblé intéressant de rechercher à partir de quel stade de développement *Litopenaeus stylirostris* devenait sensible à *Vibrio penaeicida*. Ceci a été étudié à l'aide d'infections expérimentales utilisant la souche *V. penaeicida* AM 101.

II.1.1 : Matériel et méthodes :

Les postlarves sont habituellement nommées en fonction de leur âge en jours depuis le premier stade postlarvaire, exprimé sous la forme Pn, où n est le nombre de jours depuis le premier stade postlarvaire. Les infections expérimentales sont réalisées sur des postlarves de trois lots provenant des écloséries de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent et de Mara. Les juvéniles utilisés pour ces essais proviennent de bassins de grossissement de la SASV.

Sur ces différents lots de postlarves, 12 séries d'infections expérimentales ont été réalisées sur des P17, P19, P23, P27, P31, P33, P38, P40, P44, P54, P60 et P67.

Afin d'étudier la sensibilité des postlarves en fonction du stade de développement et non en fonction de l'âge, les postlarves sont caractérisées par leur stade postlarvaire moyen. Celui-ci est déterminé par l'observation des formules rostrales (voir annexe, d'après Le Balle, 1989) de

30 à 60 postlarves du même lot le premier jour de l'infection. Il existe 9 stades postlarvaires chez *L. stylirostris* nommés PL1 à PL9. Les animaux ayant une formule rostrale définitive sont comptabilisés comme « PL 10 » pour ce calcul.

Les postlarves sont stabulées en aquarium ou en bac béton jusqu'à l'âge requis pour les infections expérimentales. Pendant cette durée, elles sont nourries avec de l'aliment commercial concassé.

Les postlarves et juvéniles sont acclimatées au plus tard 24 heures avant l'infection à la température de la salle thermorégulée (26 à 28 °C). Après comptage individuel, elles sont rincées à l'eau de mer stérile et placées en unités expérimentales remplies avec de l'eau de mer (salinité 33 à 36 ‰) filtrée sur 0,2 µm et autoclavée.

Vibrio penaeicida souche AM 101 est cultivée en bouillon de ZoBell pendant 24 heures à température ambiante en agitation permanente. Ces conditions de culture permettent d'atteindre la phase de plateau dans cette durée.

Chaque série d'infections met en jeu 3 ou 4 traitements de 48 heures à la température de la salle :

- Balnéation dans une suspension de *Vibrio penaeicida* souche AM 101 correspondant à 1% d'une culture de 24 heures en bouillon de ZoBell (soit 10ml d'une culture pure par litre) appelée traitement " pur ",
- Balnéation dans une suspension de *Vibrio penaeicida* souche AM 101 correspondant à 0,1% d'une culture de 24 heures en bouillon de ZoBell (soit 10ml d'une culture diluée au 1/10) appelée traitement " 1/10 ",
- Ces deux traitements constituent donc les lots " Infectés ".
- Balnéation dans 1% de bouillon de ZoBell stérile (soit 10ml d'un bouillon ZoBell stérile par litre) appelée traitement " ZoBell ",
- Témoin sans traitement, appelé traitement " Témoin ".

La dose infectante réelle est calculée *a posteriori* à partir du comptage sur boîtes de Pétri des colonies formées par l'étalement de 100µl de dilutions décimales du bouillon initial.

Les traitements sont réalisés en répliquats (3 ou 4 répliquats par traitement) de 15 postlarves. Les unités expérimentales sont des bouteilles Pyrex de 400 ml pour les jeunes postlarves. Pour les animaux plus grands des béciers de 1 litre sont utilisés. L'oxygénation est assurée par bullage à l'aide d'une pipette. L'alimentation au cours de l'acclimatation et au cours des infections est

constituée de Nippai® concassé d'une granulométrie adaptée distribué *ad libitum* en 2 à 3 distributions quotidiennes.

A l'issue des 48 heures d'exposition aux différents traitements, les postlarves survivantes sont comptées dans chacune des structures expérimentales.

Des témoins positifs sont réalisés pour chaque série d'infections expérimentales, afin de vérifier le pouvoir pathogène de la souche : 10 crevettes juvéniles (5-15 g) stabulées en aquarium sont infectées par injection intramusculaire de 50 µl d'une dilution 10⁻³. La série d'infections n'est validée que si la mortalité de ces juvéniles est totale en 36 heures.

Lors de la dernière série 5 réplicats de 7 crevettes de 1,5 g, provenant d'un bassin de grossissement subissent les traitements " pur ", " Témoin " et " ZoBell " dans des béciers de 3 litres, à partir de la même culture d'AM 101, et sur la même durée de 48 heures. Ce bassin avait étéensemencé avec des postlarves du même lot que celles utilisées pour la dernière série (âge P67). Leurs différences de stade de développement et de taille sont attribuables aux conditions d'élevage. Cet essai supplémentaire a pour objectif d'évaluer la sensibilité de juvéniles dans les mêmes conditions expérimentales et de vérifier si ces conditions expérimentales ne conduisent pas à une toxification des enceintes expérimentales. La biomasse utilisée dans ces essais est de 5,8 g/l, alors qu'elle n'a jamais dépassé 3 g/l dans les essais sur les postlarves. Cette charge de 3 g/l a été obtenue lors du dernier essai, où les postlarves testées avaient un poids moyen de 0,20 g.

Pour l'analyse des résultats, les données sont considérées comme suit pour le traitement statistique.

Les survies sont transformées $Survie\ transformée = Arc\ sin\ us(\sqrt{fréquence\ de\ survie})$

Les stades postlarvaires moyens sont groupés en classe :

PL 4 à PL 6 (" PL 4à6 "), PL 7 à PL 8 (" PL 7à8 "), PL 8 à PL 8,5 (" PL 8à8,5 "),
PL 8,5 à PL 9 (" PL 8,5à9 "), PL 9 à PL 9,5 (" PL 9à9,5 ") et PL > 9,5 (" PL >9,5 ").

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel StatView®.

II.1.2 : Résultats :

Les doses infectantes varient entre 6,8.10⁴ et 7,3.10⁶ CFU/ml.

Sur l'ensemble des infections réalisées, l'analyse de variance montre que les traitements "ZoBell" et "Témoin" ne sont pas statistiquement différents. (Les valeurs de p inférieures à 0,05 témoignent d'écarts significatifs.)

Tableau d'ANOVA pour Survie transformée					
	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement (3)	2	2.583	1.291	23.156	<.0001
Résidus	281	15.670	.056		

PLSD de Fisher pour Survie transformée			
Effets : traitement (3)			
Niveau de signif. 5 %			
	Ecart moyen	Ecart critique	Valeur de p
Infecté, ZoBell	-.194	.064	<.0001
Infecté, Témoin	-.188	.076	<.0001
ZoBell, Témoin	.006	.084	.8894

Afin d'augmenter la puissance statistique, ces deux traitements sont donc regroupés par la suite sous la même dénomination "Témoin".

Le traitement statistique correspond donc à la comparaison de 2 traitements "Témoin" et "Infecté", effectué grâce à un test t de Student, et ceci pour chaque classe de stade postlarvaire moyen. Ce test présenté ci-dessous montre que la sensibilité à l'infection expérimentale par *Vibrio penaeicida* souche AM 101 apparaît à partir du stade postlarvaire moyen PL9.

Test-t séries non appariées pour Survie transformée				
Variable "groupe" : traitement (2)				
Éclaté par : stade (classes)				
Ecart théorique = 0				
	Ecart moyen	DDL	t	p
Infecté, Témoin: Total	-.191	282	-6.816	<.0001
Infecté, Témoin: juvénile (2.5g)	-.742	13	-9.627	<.0001
Infecté, Témoin: PL 4à6	-.044	33	-.706	.4848
Infecté, Témoin: PL 7à8	-.104	32	-1.606	.1181
Infecté, Témoin: PL 8,5à9	-.076	22	-.898	.3787
Infecté, Témoin: PL 8à8,5	-.082	38	-1.221	.2298
Infecté, Témoin: PL 9à9,5	-.223	87	-5.540	<.0001
Infecté, Témoin: PL >9,5	-.380	45	-5.698	<.0001

Néanmoins, cette sensibilité, si elle est acquise dès le stade postlarvaire moyen PL9, ne semble pas être maximale dès ce stade. En effet, le test t de Student ci dessous montre que la mortalité obtenue chez les juvéniles de 2,5g de poids moyen soumis au même protocole d'infection est supérieure à celle obtenue chez les postlarves des lots dont le stade moyen est supérieur à PL9.

Test-t séries non appariées pour Survie transformée
Variable “groupe” : stade (classes)
Eclaté par : traitement (2)
Ecart théorique = 0

	Ecart moyen	DDL	t	p
juvénile (2.5g), PL 9à9.5: Total	-0.20	77	-2.61	0.0110
juvénile (2.5g), PL 9à9.5: Infecté	-0.53	29	-6.36	<0.0001
juvénile (2.5g), PL 9à9.5: Témoin	-0.07	46	-1.05	0.2970
juvénile (2.5g), PL >9,5: Total	-0.17	48	-1.63	0.1098
juvénile (2.5g), PL >9,5: Infecté	-0.34	15	-3.33	0.0046
juvénile (2.5g), PL >9,5: Témoin	-0.10	31	-1.23	0.2289
PL 9à9.5, PL >9,5: Total	0.03	97	0.51	0.6095
PL 9à9.5, PL >9,5: Infecté	0.19	36	2.78	0.0087
PL 9à9.5, PL >9,5: Témoin	-0.02	59	-0.45	0.6569

Il apparaît donc que les jeunes postlarves ne sont pas sensibles à l’infection expérimentale, alors que les postlarves plus âgées le sont. Ainsi, jusqu’à un stade postlarvaire moyen de PL 9, la survie n’est pas différente dans les lots infectés et dans les lots témoins. A partir de PL 9, la survie est significativement affectée par l’infection.

II.1.3 : Discussion et conclusion :

Les stades postlarvaires moyens inférieurs à PL 9 correspondent à une faible proportion d’animaux ayant une formule rostrale définitive. A partir de PL 9, une proportion importante et croissante des animaux a acquis une formule rostrale définitive, ces derniers devant alors être considérés comme des juvéniles. On peut donc considérer que l’acquisition de la sensibilité à l’infection par *Vibrio penaeicida* souche AM 101 coïncide avec l’acquisition de la formule rostrale définitive. Il apparaît ainsi que les postlarves ne sont pas sensibles à cette infection, alors que les juvéniles le sont. La mue imaginale (qui fait passer la crevette du dernier stade postlarvaire au stade juvénile caractérisé par une formule rostrale définitive) correspondrait donc à une métamorphose *sensu stricto*, s’accompagnant de modifications physiologiques et / ou immunologiques responsables de l’acquisition de cette sensibilité. Cette acquisition “brutale” de la sensibilité à un pathogène évoque la possibilité d’existence de récepteurs membranaires qui seraient impliquées dans un mécanisme de virulence de *Vibrio penaeicida* souche AM 101 à l’égard de *L. stylirostris*.

Au niveau de la gestion pratique du Syndrome 93, ce résultat implique que lesensemencements des bassins, fréquemment réalisés avec des postlarves jeunes (50% de formules rostrales > 5/0, ce qui correspond à 50% d’animaux ayant atteint le stade PL7, donc à un stade postlarvaire

moyen inférieur ou égal à PL7) ne présentent pas de risque de déclenchement par le stress du transfert d'une vibriose due à *V. penaeicida*.

A l'opposé, ces résultats permettraient d'expliquer les mauvaises survies qui ont été observées lorsque des transferts de juvéniles d'un à deux grammes pré-grossis en bassins à plus forte densité avaient lieu en saison de transition : il semble que ces mortalités suivant les transferts de juvéniles soient objectivement attribuables à une vibriose à *V. penaeicida*, et qu'elles ne seraient pas notablement diminuées par un transfert plus précoce. La technique de pré-grossissement, qui permet pourtant un meilleur taux d'utilisation des bassins de grossissement trouve donc une limitation dans ce contexte pathologique.

II.2. Étude de la toxicité des surnageants de culture de souches de *Vibrio* spp. pathogènes pour les crevettes : *Vibrio penaeicida* souche AM 101, *V. nigripulchritudo* souche AM 102, *V. alginolyticus* souche SF 5.

Publication n°3

On distingue deux types de toxines bactériennes : les endotoxines et les exotoxines.

Les endotoxines correspondent à une fraction de la paroi des bactéries Gram négatif, lipopolysaccharide ou LPS. Ces endotoxines sont donc liées à la cellule bactérienne. Leur action sur un organisme varie théoriquement peu d'une espèce bactérienne à une autre au sein du même genre.

Les exotoxines quant à elles sont excrétées, c'est à dire libérées hors de la cellule bactérienne. Elles sont sujettes à de nombreuses variations adaptatives, parfois au sein même d'une espèce bactérienne. Les exotoxines jouent fréquemment un rôle prépondérant dans la pathogénie des maladies bactériennes (Finlay et Falkow, 1997). Toutefois, aucune connaissance n'était disponible pour les espèces *Vibrio penaeicida* et *V. nigripulchritudo* qui sont les espèces pathogènes responsables de mortalité de crevettes en Nouvelle-Calédonie.

Des exotoxines ont été mises en évidence chez des *Vibrio* pathogènes de poissons ou de bivalves (Brown et Roland 1984 ; Fouz *et al.* 1993 et 1994 ; Nottage et Birkbeck 1986 et 1987 ; Pedersen *et al.* 1997 ; Rodrigues *et al.*, 1993 ; Toranzo *et al.*, 1983). Plus récemment, ces facteurs de virulence ont également été étudiés chez des souches pathogènes de crevettes Pénéides (Lee *et al.*, 1996 et 1997a et b ; Liu et Lee, 1999).

Ces deux types de toxines bactériennes ont été étudiés chez les souches *Vibrio penaeicida* AM 101, *V. nigripulchritudo* AM 102, *V. alginolyticus* SF 5. Seuls les travaux sur la toxicité des produits extracellulaires, susceptibles de contenir une ou des exotoxines sont présentés ici.

II.2.1 : Matériel et méthodes :

II.2.1.1 : Conditions de culture

Chaque souche étudiée est mise en culture en « bouillon cœur cerveau » (BHI) dont la salinité est ajustée à 25 ‰ par ajout de sel de mer artificiel (Instant Ocean®). En effet, l'utilisation d'un milieu riche peut promouvoir l'expression d'exotoxines *in vitro* (Nishibuchi et Seidler, 1983). Huit millilitres de milieu sont placés dans des tubes de culture de 25 ml, puis stérilisés

par autoclavage. Les tubesensemencés sont inclinés et incubés 24, 48 et 72 heures à la température du laboratoire (25°C) en agitation permanente (200 rpm). Ultérieurement, des cultures de 140 ml sont réalisées dans des bouteilles de 500 ml. Ces bouteilles sont inclinées et incubées 48 heures à température du laboratoire (25°C) en agitation permanente (150 rpm).

Enfin, la température constituant un facteur déclenchant majeur du Syndrome 93, l'activité toxique des surnageants de cultures de *V. penaeicida* souches Calédonienne AM 101 et japonaise KH-1^T cultivées à différentes températures a été étudiée *in vivo* par injection à des *L. stylirostris* juvéniles.

II.2.1.2 : Préparation, conservation et vérification des produits extracellulaires

Après centrifugation des cultures à 7 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, les surnageants obtenus sont filtrés sur 0,2 µm et étudiés comme préparation de produits extracellulaires (Newman et Feng, 1982). Ces préparations sont congelées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Une préparation témoin est réalisée selon le même protocole à partir de BHI stérile. La stérilité de chacune des préparations est vérifiée par étalement de 100 µl sur une boîte de Pétri de milieu de ZoBell incubée 2 jours à 30°C.

Les activités enzymatiques associées aux produits extracellulaires testés ont été évaluées à l'aide des galeries API-zym (Bio-Mérieux), permettant de mettre en évidence facilement un nombre limité d'activités enzymatiques. Chaque cupule est remplie avec 65 µl de la préparation de produits extracellulaires à analyser. La galerie est incubée 4 à 5 heures à 30°C. Les résultats sont lus à l'aide d'un nuancier colorimétrique d'après les préconisations du fabricant.

II.2.1.3 : Toxicité in vivo des produits extracellulaires

Cinquante µl de chacune des préparations de produits extracellulaires ainsi que de la préparation témoin sont injectés par voie intramusculaire à des lots de crevettes placées en aquarium. Chaque préparation est testée en triplicat. La mortalité est suivie pendant 72 heures. A l'issue des 72 heures de stabulation, des comptages hématocytaires sont effectués sur certains des animaux survivants en stade de mue C de chaque lot (Le Moullac *et al.*, 1997). Lorsque la survie était insuffisante à l'issue des 72 heures, l'expérience a été renouvelée, et des comptages hématocytaires ont été réalisés en cours d'expérience sur des crevettes en stade de mue C.

II.2.1.4 : Cytotoxicité des produits extracellulaires

Les effets *in vitro* des produits extracellulaires et préparation témoin ont été étudiés sur des cellules de poisson et de crevette. La lignée cellulaire de poisson est la lignée EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) qui provient de lésions épidermiques hyperplastiques induites par un herpes-virus chez une carpe. Les explants primaires de cellules ovariennes et d'hémocytes de *Litopenaeus stylirostris* ont été préparées d'après la technique de Le Groumellec *et al.*, (1995) (voir annexe technique). Des explants primaires âgés de 3 jours ont été utilisés pour ces essais.

Avant l'ajout des produits extracellulaires, les milieux de cultures sont remplacés par du milieu frais. Cinq microlitres de chacune des préparations, ainsi que de la préparation témoin sont mélangés aux 1,5 millilitres de milieu de culture des cellules. Les cultures sont alors incubées à 26 +/- 1°C pendant 48 heures pour les cellules EPC de Poisson, et 20 heures pour les explants primaires de crevettes. L'observation est ensuite réalisée à l'état frais puis après coloration au GIEMSA.

II.2.2 : Résultats :

Les essais préliminaires réalisés avec des cultures d'âge différents ont permis de sélectionner une durée de culture de 48 heures pour les tests suivants. Cette durée permet généralement d'obtenir une culture en phase de plateau atteignant des concentrations supérieures à 10⁹ cellules par millilitre dans les conditions de culture décrites.

II.2.2.1 : Toxicité *in vivo* des surnageants de cultures à 25°C

Les injections intramusculaires montrent une toxicité des produits extracellulaires de *Vibrio nigripulchritudo* dont l'injection est rapidement létale. La mortalité des crevettes est totale moins de 24 heures après l'injection ($\chi^2 = 56,5$; $p < 0,001$). Les deux autres préparations de produits extracellulaires testées (*V. penaeicida* et *V. alginolyticus*) ne présentent pas de toxicité ou celle-ci n'est pas létale pour les crevettes ($\chi^2 < 2,4$; $p > 0,10$).

Les comptages hématocytaires réalisés en cours d'expérience sur des crevettes témoins ou injectées avec les produits extracellulaires de *V. nigripulchritudo* AM 102 montrent une chute rapide et brutale du nombre d'hémocytes circulants dès 2 heures après l'injection. Une chute beaucoup plus importante du nombre d'hémocytes circulants se produit entre 14 et 23 heures

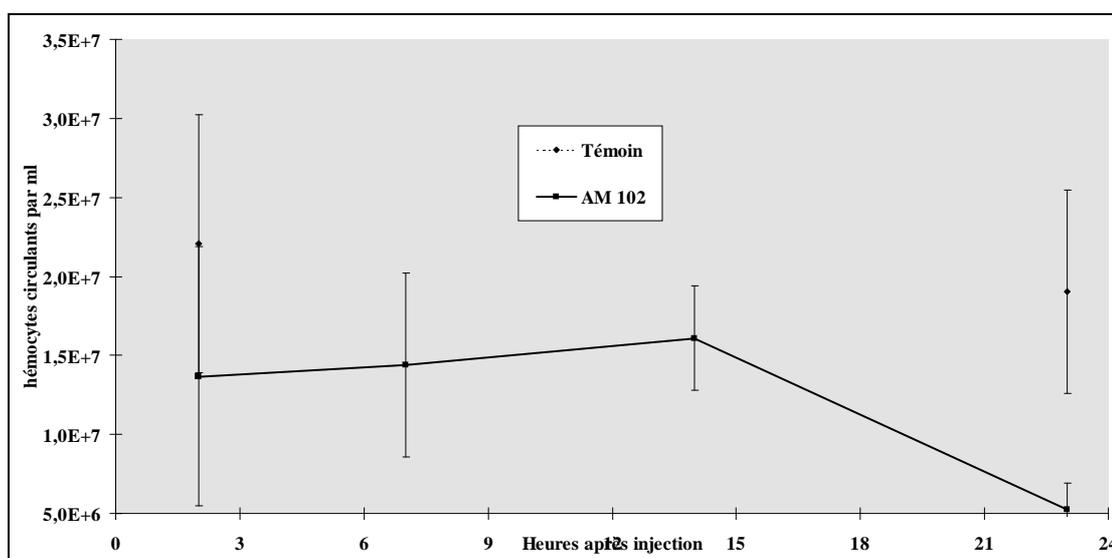
après l'injection. Les hémocytes circulants sont alors environ 4 fois moins nombreux chez les crevettes (pourtant survivantes) injectées avec les produits extracellulaires qu'ils ne le sont chez les crevettes injectées avec la préparation témoin ($t = 3,231$; $p = 0,003$).

Ce résultat évoque la présence dans les surnageants de culture d'au moins un facteur toxique à action hémocytolytique.

Ces résultats sont présentés dans le graphique 7 suivant.

Graphique 7 : Comptages hémocytaires des crevettes après injection de 50 μ l de surnageant d'une culture de *V. nigripulchritudo* AM 102 à 25°C.

(moyenne et écarts types représentés).



II.2.2.2 : Cytotoxicité des produits extracellulaires de cultures à 25°C

Tous les produits extracellulaires montrent un effet cytotoxique sur cellules de crevettes, plus marqué sur les hémocytes. Cet effet plus important sur les hémocytes peut s'expliquer par la présence dans les produits extracellulaires de LPS provenant de fragments de parois bactériennes inévitablement présents dans des cultures bactériennes en phase de plateau. Ce LPS peut, même en très faible quantité, déclencher l'activation du système de la prophénoloxydase (Söderhäll et Häll, 1984). A l'opposé, les cellules ovariennes ne sont pas affectées par cette cascade de la prophénoloxydase et les effets cytotoxiques observés sur ces cellules correspondent donc à une réelle cytotoxicité des produits extracellulaires testés.

Les effets cytotoxiques les plus importants sont observés avec les produits extracellulaires des souches hautement pathogènes *V. penaeicida* AM 101 et *V. nigripulchritudo* AM 102. L'effet observé avec les produits extracellulaires de *V. alginolyticus* SF 5 est moindre. On note

également de façon intéressante qu'aucun effet cytopathogène n'est noté sur la lignée de cellules de Poisson EPC. Les éléments toxiques contenus dans les produits extracellulaires de ces souches pathogènes pour les crevettes Pénéides montrent donc une spécificité d'action sur les cellules de crevettes. Les observations des cellules traitées avec les produits extracellulaires sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Aspects des cultures cellulaires après ajout de surnageants de cultures de *Vibrio* cultivés à 25°C.

Surnageant d'une culture de :	EPC (lignée Poisson)	Ovaire <i>L. stylirostris</i>	Hémocytes <i>L. stylirostris</i>
<i>V. penaeicida</i> AM 101	Aspect habituel des EPC	Noyau non entouré de cytoplasme et cytoplasme dentelé ; chromatine marginalisée.	Aspect rétracté et étiré des cellules ; petits fragments de cytoplasme sur le fond de la boîte.
<i>V. nigripulchritudo</i> AM 102	Aspect habituel des EPC	Cytoplasme fragmenté et noyaux morcelés.	Noyaux qui ne sont pas entourés de cytoplasme et cytoplasme fragmenté.
<i>V. alginolyticus</i> SF 5	Aspect habituel des EPC	Cellules entourées de globules lipidiques.	Cytoplasme fragmenté et chromatine marginalisée (pour certaines cellules).
témoin exotoxine	Aspect habituel des EPC	Normal	Normal

II.2.2.3 : Toxicité in vivo des surnageants de cultures à 20°C et 30°C

Les résultats des essais sur des cultures réalisées à 20 et 30°C sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous. La mortalité des crevettes injectées avec le surnageant d'une culture bactérienne incubée à 20°C est totale et rapide. A l'opposé, comme cela avait été montré à 25°C, aucune mortalité significative n'a lieu lorsque le surnageant injecté provient d'une culture incubée à 30°C.

Les cultures incubées à 30°C ont une croissance plus rapide, comme le montre le tableau 3.

Il a été montré que la sécrétion d'exotoxines pouvait être dépendante de la phase de culture dans les espèces *Pseudomonas aeruginosa* (Liu, 1957) et *Vibrio vulnificus* (Kreger and Lockwood, 1981). Ici, les surnageants de cultures à 30°C ne démontrent pas d'effet toxique, qu'ils aient la même concentration cellulaire initiale ou la même durée de culture que les cultures à 20°C. Il est donc fortement probable que l'expression du facteur toxique mis en évidence dans les surnageants de culture de *Vibrio penaeicida* AM 101 soit régulée par la température.

Tableau 3 : Survie de crevettes injectées avec les surnageants de culture de *V. penaeicida* cultivé à différentes températures.

Souche de <i>V. penaeicida</i> et conditions de culture.	densité cellulaire initiale de la culture	survie des crevettes injectées (MTD: median time to death)
AM 101; 30°C / 48 heures	10 ^{8.2} CFU / ml	95 %
AM 101; 30°C / 22 heures	10 ^{7.9} CFU / ml	100 %
AM 101; 20°C / 48 heures	10 ^{7.9} CFU / ml	0 % (MTD: 12.5 heures)
KH-1 ^T ; 30°C / 48 heures	10 ^{7.7} CFU / ml	93 %
KH-1 ^T ; 30°C / 22 heures	10 ^{8.8} CFU / ml	93 %
KH-1 ^T ; 20°C / 48 heures	10 ^{9.2} CFU / ml	93 %
Témoin	0	95 %

Le chauffage du surnageant à 80°C pendant 10 minutes permet de supprimer (ou de diminuer très fortement) l'effet toxique. Cet élément confirme que la toxicité des produits extracellulaires est due à une protéine excrétée dans le milieu de culture.

Aucune mortalité significative n'est observée sur les crevettes injectées avec les surnageants de culture de *Vibrio penaeicida* KH-1^T, quelque soit la température de culture. Un effet délétère de l'injection des surnageants est noté au niveau des comptages hématocytaires. Cet effet est significatif pour les surnageants de cultures incubées à 30°C.

II.2.2.4 : Activités enzymatiques associées aux produits extracellulaires toxiques et non toxiques

Les activités enzymatiques associées aux surnageants de culture sont présentées dans le tableau 4.

La température de culture n'a pas d'effet majeur sur les enzymes excrétées par les souches de *Vibrio penaeicida* AM 101 dans le surnageant de culture. Aucune activité enzymatique particulière n'a pu être associée à l'effet toxique des surnageants. Aucune des activités enzymatiques ainsi démontrées ne peut donc être considérée comme correspondant à un facteur de virulence.

Tableau 4 : Activités enzymatiques détectées dans les surnageants de culture de *V. penaeicida*.

Souche de <i>V. penaeicida</i> et température de culture	AM 101 20°C	AM 101 30°C	KH-1 ^T 24°C
Enzyme			
Phosphatase alcaline	+++++	+++++	+++
Phosphatase acide	+++++	+++++	+
Estérase (C 4)	++	++	+
Estérase Lipase (C 8)	++	++	++
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+++	+
N-acétyl-β glucosaminidase	++	++++	+

II.2.3 : Discussion :

Cette expérimentation a permis de montrer une toxicité des produits extracellulaires de *Vibrio nigripulchritudo* souche AM 102 et de *V. penaeicida* souche AM 101. Ces deux souches sont particulièrement pathogènes pour *Litopenaeus stylirostris* en infection expérimentale (Saulnier *et al.*, 1999 ; Goarant et Haffner, données non publiées), et responsables d'importants épisodes de mortalité des crevettes en grossissement en Nouvelle-Calédonie. A l'opposé, aucun essai *in vivo* n'a permis de mettre en évidence une toxicité des produits extracellulaires de *V. alginolyticus* souche SF 5. Cette souche a un pouvoir pathogène expérimental beaucoup plus

faible, sa DL 50 sur 48 heures en injection intramusculaire étant de l'ordre de $1,6 \times 10^4$ CFU / g (Goarant et Haffner, données non publiées).

L'activité toxique des produits extracellulaires de *V. nigripulchritudo* AM 102 est létale, et pourrait agir par hémocytolyse, comme en témoignent les comptages hémocytaires réalisés sur les animaux soumis à l'injection de surnageant de culture.

La toxicité des produits extracellulaires de *Vibrio penaeicida* AM 101 n'est observée *in vivo* que lorsque cette souche est cultivée à basse température. Cet élément met en évidence l'effet de la température sur la pathogénicité de cette souche à l'égard de *L. stylirostris*. Cette toxicité des produits extracellulaires pourrait être liée à une exotoxine thermolabile qu'il serait intéressant de caractériser. Les températures basses ne provoquent par contre pas de sécrétion de facteur toxique létal pour *L. stylirostris* par la souche type de *Vibrio penaeicida* KH-1^T, d'origine japonaise. Les surnageants de culture ont un effet toxique sur les crevettes qui est montré par la chute des comptages hémocytaires. Toutefois, cet effet n'est significatif que pour les surnageants des cultures incubées à 30°C. À cet égard, il est intéressant de comparer ces résultats avec l'incidence des vibrioses à *V. penaeicida* en Nouvelle-Calédonie et au Japon :

- En Nouvelle-Calédonie, le Syndrome 93 s'exprime principalement sous forme de flambées épizootiques à la suite de chutes de température ;
- Au Japon, de la Peña *et al.* (1992) considèrent que cette vibriose s'exprime sur *Marsupenaeus japonicus* au moment des températures les plus élevées de l'année, ou dans les périodes suivant ces pics de température.

Il est également possible que la souche type KH-1^T (souche de collection) soit quelque peu atténuée par des repiquages successifs.

Ces essais démontrent d'autre part l'intérêt des explants primaires de cellules ovariennes de crevettes qui constituent un bon modèle pour l'évaluation *in vitro* de l'activité cytopathogène de surnageants de culture des souches bactériennes isolées de crevettes Pénéides. La sensibilité de ces tests *in vitro* est plus importante que celle des essais *in vivo*. Ces essais *in vitro* mettent de plus en évidence une spécificité des facteurs cytopathogènes, puisque aucun effet cytopathogène n'a été noté sur la lignée cellulaire de Poisson.

Un certain nombre d'activités enzymatiques ont été démontrées dans ces surnageants, mais il n'a pas été possible d'associer la toxicité à une activité exoenzymatique particulière.

Néanmoins, ces enzymes excrétées sont considérées par certains auteurs comme des facteurs de pathogénicité potentiels (Borrego *et al.*, 1996).

La température est fréquemment associée à la régulation des facteurs de virulence ou de pathogénicité chez les bactéries pathogènes (Finlay et Falkow, 1997). Il n'est pas possible ici de déterminer si le facteur toxique létal n'est pas (ou beaucoup moins) sécrété à 30°C, ou s'il est dégradé dans le bouillon de culture par une exoenzyme excrétée ou plus active à 30°C. Cette hypothèse apparaît toutefois peu probable.

Il est notable que la régulation des facteurs de virulence ou de pathogénicité chez les bactéries pathogènes implique souvent plusieurs facteurs de virulence par le biais de gènes voisins localisés sur des opérons. Il est ainsi possible que d'autres facteurs de virulence que la sécrétion de produits extracellulaires toxiques soient contrôlés par ce même « facteur température ».

II.2.4 : Implications pratiques :

La température comme élément de régulation de la virulence chez *Vibrio penaeicida* pourrait expliquer le facteur déclenchant majeur des épisodes de mortalité du Syndrome 93 en Nouvelle-Calédonie. La température a donc un effet direct dans les relations hôte - pathogène entre *Vibrio penaeicida* et *L. stylirostris*. Les mesures pratiques pouvant limiter les baisses de la température dans les bassins de crevettes peuvent donc avoir un effet bénéfique direct. Ainsi, il a été montré que les chutes les plus spectaculaires de température étaient liées à des périodes de fort alizé (Chapitre I) : la mise en place de haies coupe-vent pourraient limiter cet effet. De même, et pour les projets futurs, la construction de bassins plus profonds limiterait cet impact du vent sur le refroidissement de la colonne d'eau.

II.3. Etude d'une voie d'entrée possible du pathogène : Mise en évidence d'une chitinase chez *Vibrio penaeicida* souche AM 101, *V. nigripulchritudo* souche AM 102, *V. alginolyticus* souche SF 5 et relation éventuelle avec des lésions cuticulaires (« points blancs »).

Publication n° 4

L'observation de points blancs sur la carapace de géniteurs en maturation à l'écloserie du Nord à Koné, en mai 1997, a provoqué un grand émoi dans la filière crevettes en Nouvelle-Calédonie. En effet, ces lésions évoquaient celles produites par le baculovirus responsable de la maladie des points blancs « White Spot Syndrome », décrite chez *P. monodon*, *P. japonicus*, et d'autres espèces de crevettes Pénéides élevées, principalement en Asie du Sud-Est (Lightner, 1996). Plusieurs descriptions de ce virus ont donné lieu à une certaine confusion du fait des différents noms donnés à ce virus (WSBV, WSSV, HHNBV, RV-PJ #1, RV-PJ #2 et SEMBV). Les appellations « White Spot Syndrome Baculovirus complex » ou WSSV sont désormais retenues par l'usage. Plusieurs sondes nucléiques ont été mises au point à partir d'isolats de ces virus. Deux de ces sondes ont été testées sur des crevettes de l'écloserie du Nord au laboratoire du Dr. Bonami (CNRS – IFREMER) à Montpellier, à l'initiative du Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire. Ces deux sondes donnent des résultats négatifs (R. Costa, com. pers.). De même, les examens histologiques effectués par le LTDV ne montrent pas les lésions considérées comme pathognomoniques de cette pathologie virale. Depuis, l'existence de lésions identiques a été confirmée sur de très nombreux lots de crevettes, notamment des crevettes conservées (congelées ou fixées au Davidson), dont la conservation date de octobre 1995 (SASV), voire mai 1995 (LTDV).

Les autres hypothèses avancées pour expliquer ces lésions ont été des causes toxiques, nutritionnelles, fongiques ou bactériennes. Les hypothèses nutritionnelles ont été partiellement invalidées par l'épidémiologie de la première observation (géniteurs élevés à très faible densité et recevant une alimentation riche), et les recherches bibliographiques entreprises sur ce sujet. Les hypothèses toxiques semblent peu probables, puisque ces animaux ne montraient aucun signe de maladie à l'exception de ces points blancs sur la carapace, et que la présence de ces lésions ne semble pas être localisée à un seul site d'élevage. L'observation à l'état frais des lésions ne permet pas de mettre en évidence d'éléments figurés de nature fongique, ni de fortes concentrations bactériennes. L'hypothèse s'est portée sur le caractère cicatriciel ou secondaire de cette lésion, ne se révélant qu'après le passage, voire l'élimination d'un agent causal. En

particulier, des microorganismes chitinolytiques, c'est à dire capables de sécréter une enzyme digérant la chitine (constituant principal de la carapace des Arthropodes) nous ont semblé pouvoir causer ce type de lésions.

Enfin, et du fait de la saison d'observation de ces lésions, un lien a été recherché avec les épisodes de syndrome 93.

Par la suite, une incidence importante de lésions dites « black spots » ou « bacterial shell disease » a été observée sur les crevettes de la ferme Blue Lagoon Farms, située sur le même site que l'écloserie du Nord, au bord de la plage de Foué.

Du fait de l'analogie entre ces deux types de lésions, l'hypothèse que les points blancs puissent correspondre à une forme atténuée de maladie bactérienne de la carapace a été explorée.

II.3.1 : Données bibliographiques :

II.3.1.1 : La structure de la cuticule des Crustacés

(d'après Goffinet et Jeuniaux, 1994 ; Compère, 1988)

La cuticule est constituée de deux couches superposées. La plus externe, l'épicuticule a une épaisseur de 0,1 à 3 µm. Elle est mise en place dès le début de la prémue (début du stade D), et constitue donc à tout moment une barrière entre l'animal et le milieu extérieur. Elle contient notamment sur sa face externe (épicuticule externe) une fine couche de cuticuline non digérée par les chitinases. La couche la plus épaisse (procuticule) est située en dessous et est constituée d'une matrice organique d'organisation complexe (chitine et protéines) plus ou moins calcifiée selon les espèces et la localisation.

Les germes chitinolytiques ne peuvent donc se développer qu'à la faveur d'une lésion (même microscopique) de l'épicuticule, rendant accessible le substrat de leurs exoenzymes.

II.3.1.2 : La maladie bactérienne de la carapace (“ bacterial shell disease ”)

Chez les crevettes Pénéides, plusieurs publications font mention de lésions de type “ black spots ”. La plupart de ces publications sont des revues relativement anciennes des maladies des crevettes, mais les photos montrent des lésions en tout point comparables à celles observées sur les crevettes de la ferme BLF.

- Ainsi, Johnson (1978), dans son “ Handbook of shrimp diseases ” décrit ces lésions, et leur attribue comme origine l’attaque de lésions primaires traumatiques par des bactéries chitinolytiques.
- Lightner (1988 b) dans un chapitre intitulé “ Maladie bactérienne de la carapace ” (“ Bacterial shell disease ”) décrit des zones érodées de la cuticule, brunes à noires, commençant par de petites lésions qui peuvent ensuite s’élargir rapidement. La photo est la même que celle proposée par Johnson (1978). Il attribue ces lésions à de nombreuses bactéries capables de produire des lipases, protéases et chitinases, appartenant aux genres *Vibrio*, *Aeromonas*, *Spirillum* et *Flavobacterium*. Il signale que des champignons (*Fusarium solanii*, *Haliphthoros milfordensis* et *Aktinsiella* sp.) provoquent des lésions d’apparence similaire. Il considère que ces lésions disparaissent à la mue, sauf dans le cas d’atteintes des tissus sous-jacents par les agents primaires ou par des surinfections. Les traitements qu’il propose sont basés sur l’antibiothérapie. Les mesures préventives proposées sont classiques, comme le maintien d’une bonne qualité de l’eau d’élevage, la réduction du nombre de germes par stérilisation ou filtration (dans le cas des stades larvaires). Il conseille également de minimiser les manipulations, la surpopulation (“ overcrowding ”) et toutes les formes de stress.
- Giorgetti (1990), dans une revue sur les problèmes pathologiques rencontrés dans les élevages de crevettes (*Marsupenaeus japonicus*) en Italie, publie des photographies des mêmes lésions, et les considère dues à l’action de bactéries chitinolytiques des genres *Vibrio* et *Alcaligenes* spp..

Ce type de lésions est également décrit chez d’autres Crustacés.

- Des points noirs sont décrits chez la Chevrette (“ Black spot disease ”, Brock, 1988). Ils sont attribués à des bactéries chitinolytiques ou au champignon *Fusarium* sp..
- Chez le Homard, Fisher (1988) décrit des lésions cuticulaires érosives sous le nom de “ Shell disease ”, provoquant ensuite mélanisation et nécrose, qu’il attribue à des bactéries chitinolytiques, généralement Gram négatives.
- Chez le Crabe bleu, Sindermann (1988), décrit sous le même nom de “ Shell disease ” des lésions nécrotiques de l’exosquelette. Il signale que dans les stades précoces, cette pathologie se traduit par de nombreuses marques ponctiformes brunes centrées sur de petites dépressions. Les lésions nécrotiques, tardives, résultent de la confluence de ces petites lésions. Cette pathologie est attribuée à des bactéries chitinolytiques appartenant à plusieurs genres. De façon intéressante, cet auteur note une aggravation des lésions avec la température, comme cela a été noté pour les points blancs à l’écloserie du Nord.

- Cook et Lofton (1973) étudient la “shell disease” chez des Crabes bleus (*Callinectes sapidus*) et 3 espèces de Pénéides (*Litopenaeus setiferus*, *Farfantepenaeus duorarum*, *Farfantepenaeus aztecus*) de différentes origines géographiques. Ils isolent systématiquement une souche du genre *Vibrio* (ex *Beneckeia*), chitinolytique. Cette souche est capable de reproduire expérimentalement les lésions, mais uniquement sur des carapaces préalablement lésées.

La structure de la cuticule, qui implique la nécessité de microlésions pour le développement des lésions profondes, peut expliquer le rôle joué par la densité et les manipulations des animaux (Cook et Lofton, 1973 ; Lightner, 1988 b ; Fisher, 1988) dans le caractère contagieux de ces lésions.

Les risques liés à la présence de ces lésions qu'énoncent ces auteurs sont d'une part que ces lésions peuvent constituer des portes d'entrée pour des germes plus virulents, d'autre part le caractère contagieux de ces lésions. Ainsi, Sindermann (1988) conseille l'isolement des individus atteints chez le crabe bleu. Le traitement préconisé est généralement antibiotique (après vérification de l'absence de présence fongique pour certains auteurs) ou, à défaut, d'attendre la mue et de limiter au maximum les stress et manipulations et de maintenir une bonne qualité du milieu d'élevage pour éviter des surinfections pendant ce temps...

Des attaques de la cuticule par des germes chitinolytiques ont aussi été observées en microscopie électronique sur de petits Crustacés planctoniques.

- Ainsi, Carman et Dobbs (1997) publient un cliché en microscopie électronique (M.E.) à balayage de microlésions de la cuticule d'un copépode associées à des bactéries montrant un attachement polaire, qu'il juge être des germes chitinolytiques.
- Nagasawa (1987) montre, par la même technique de M.E. à balayage, des cicatrices, pores et fissures sur la cuticule de copépodes causées par l'attachement polaire ou latéral de bactéries, qu'il suppose chitinolytiques. Il propose de qualifier ces bactéries non plus d'épibiotiques, mais de parasites.

II.3.1.3 : La cicatrisation chez les Arthropodes

(d'après Bauchau et Mengeot, 1978)

« Toute atteinte à l'intégrité des téguments représente en effet une éventualité redoutable pour un organisme à circulation ouverte. (...) Toute blessure ouverte à hauteur de la carapace suscite [une] intervention énergique des hémocytes, ils obturent la plaie et concourent ainsi à la

stabilité du milieu intérieur. [II] se forme un mince coagulum constitué par un réseau cellulaire dont l'intermaille est bouchée par un gel. Ce caillot se substitue temporairement aux couches cuticulaires avariées et sa mélanisation sous l'influence de la phénoloxydase des granulocytes l'imperméabilise davantage. Sous la protection de cette croûte noirâtre, les cellules épidermiques régénèrent et sécrètent une cuticule de remplacement, refermant de façon définitive la blessure tégumentaire. »

Ratcliffe et Rowley (1979) décrivent ce mécanisme, identique chez les Insectes.

« Dans les 10 minutes suivant la blessure, la coagulation de l'hémolymphe résultant de la dégranulation des hémocytes a eu lieu, participant ainsi à la fermeture de la plaie. Ensuite, les agrégats hémocytaires se compactent, se mélanisent et apparaissent comme une structure similaire aux nodules immatures formés en réponse à l'injection de bactéries dans l'hémocèle. Six heures après la lésion, une seconde phase d'intervention des hémocytes est observable, qui implique un afflux massif d'hémocytes au niveau de la blessure. Ces cellules s'étalent sous le site de la plaie, semblant répondre à un stimulus, peut-être un « facteur-plaie » produit par les hémocytes ou les cellules épidermiques lésés. Environ 12 heures après la blessure, ces cellules sont plus aplaties et forment une structure à la base de la plaie ressemblant à une capsule désorganisée. »

La cicatrisation de l'épithélium sous-cuticulaire se déroule donc « à l'abri », sous le caillot ainsi formé. Comme toute cicatrisation épithéliale, elle se produit par glissement centripète depuis les zones saines. On conçoit ainsi que plus le point noir (donc l'orifice) est de grande taille et apparaît tardivement dans le cycle de mue, plus la cicatrisation cuticulaire sera longue et tardive.

Cet épithélium est responsable de la sécrétion de la nouvelle cuticule. Ainsi, une petite lésion apparaissant précocement dans le cycle de mue disparaîtra à la mue suivante. A l'opposé, une lésion tardive, et / ou de grande taille ne pourra pas être circonscrite avant la mue, et la lésion cuticulaire restera visible après la mue.

II.3.2 : Matériel et méthodes :

II.3.2.1 : Observation directe des lésions à l'état frais

La relation entre la présence de ces lésions et la mue a notamment pu être étudiée par ce moyen : sur certaines des crevettes décortiquées pour l'examen de leur cuticule, la présence de

la future cuticule sous-jacente (stade de mue D2) a permis son observation attentive à la loupe binoculaire.

II.3.2.2 : Analyse bactériologique sur les crevettes présentant des points blancs

La flore bactérienne de l'hémolymphe est étudiée de façon classique : après un rinçage abondant à l'eau de mer stérile, l'hémolymphe est ponctionnée de façon aseptique dans le sinus ventral à l'aide d'une seringue à insuline. Une goutte d'hémolymphe est étalée sur les milieux TCBS (flore présumée *Vibrionaceae*) et ZoBell additionné de chitine (flore hétérotrophe totale et étude du caractère chitinase).

La flore bactérienne épibiotique de la cuticule a été étudiée par étalement sur les mêmes milieux d'un grattage d'environ 1/2 cm² de cuticule du céphalothorax, après rinçage abondant à l'eau de mer stérile.

II.3.2.3 : Recherche d'une chitinase chez les souches de *Vibrio sp. pathogènes*

Cette recherche est effectuée en boîtes de Pétri, selon la méthode décrite par Hansen et Sørheim (1991). La chitine est produite par extraction acide à partir de carapaces isolées et séchées à 60 °C, puis précipitée à l'éthanol (voir annexe). Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, celle-ci est incorporée dans le milieu de ZoBell, qui est autoclavé, puis coulé en boîte de Pétri. Le même milieu est préparé à partir de chitine du commerce (Sigma) afin de vérifier nos résultats. Les souches *Vibrio penaeicida* AM 101, *V. nigripulchritudo* AM 102 et *V. alginolyticus* SF 5 sont mises en culture sur ce milieu. De l'eau d'un bassin diluée au 1/100 est également étalée sur ce milieu. Les boîtes sont mises à incuber 7 jours à 30 °C.

II.3.2.4 : Utilisation par les souches chitinase + de chitine comme seule source de Carbone et d'Azote

Une colonie de chacune des souches chitinase + estensemencée dans un milieu liquide constitué de chitine et d'eau de mer artificielle (Instant Ocean®), qui est incubé 7 jours à 30 °C. L'apparition d'un trouble dans le tube signale la croissance bactérienne.

II.3.3 : Résultats :

II.3.3.1. Description des lésions

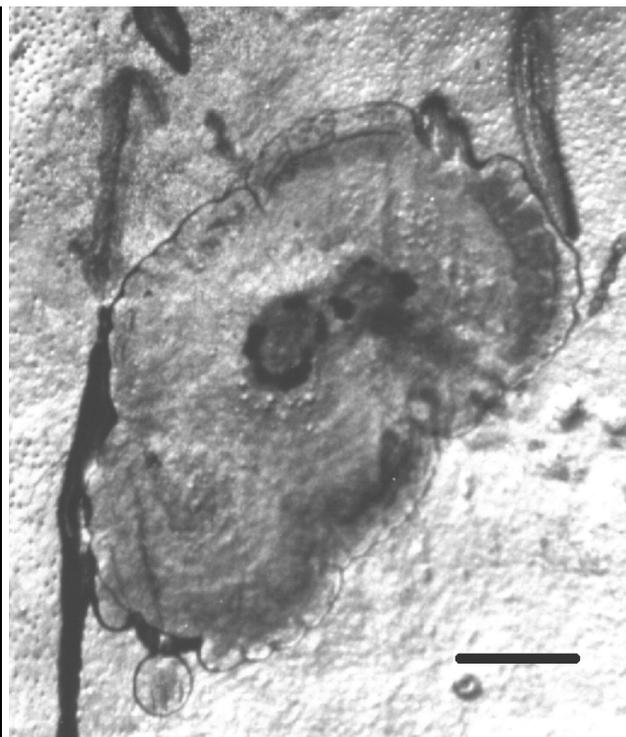
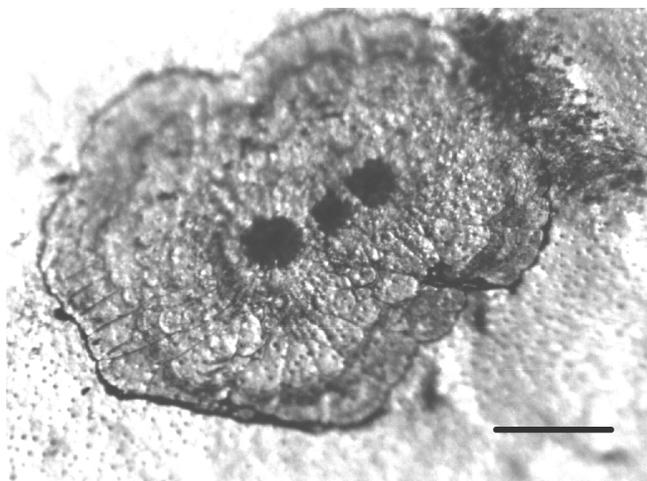
Les points blancs apparaissent comme des lésions généralement limitées à la cuticule, n'atteignant que très rarement les tissus sous-jacents. Ces lésions apparaissent centrées sur une petite zone d'apparence « bulleuse » entourée d'un ou de halo(s) concentrique(s) blanchâtre(s) semblant correspondre à une zone de désorganisation de la cuticule. Dans quelques cas, le centre montre une petite zone de mélanisation, témoignant d'une atteinte des tissus sous-jacents. Cette zone de mélanisation, quand elle existe, n'est visible qu'à la loupe binoculaire. (Voir figure 6). Sur 5 crevettes en stade D2 décortiquées sur lesquelles des points blancs ont été observés, aucune des 5 futures cuticules ne comportait de point blanc. Ce type de lésions disparaît donc à la mue.

Les lésions de type « points noirs » correspondent à un orifice ou une brèche dans la cuticule. Ils sont circonscrits par un halo blanchâtre correspondant à une zone où la cuticule encore présente est fragilisée. (Voir figure 6). Le phénomène de réparation de la plaie cuticulaire met en œuvre des hémocytes qui forment un caillot au niveau de la brèche cuticulaire. Celui-ci adhère aux bords de la plaie, puis subit un phénomène de mélanisation. Ces lésions sont similaires des « nécroses externes » des élevages larvaires. On note par ailleurs que :

- Sur les crevettes observées, les points noirs ne sont jamais les seules lésions cuticulaires, mais sont accompagnés à proximité par des points blancs de différentes taille et gravité.
- Certains des points blancs observés à la loupe binoculaire montrent une petite zone de mélanisation centrale. (Voir figure 6).
- Sur les points blancs de plus grand diamètre, un amincissement net de la cuticule, accompagné d'une fragilisation sont notés.

Figure 6 : Lésions de la cuticule de type “ points blancs ”

La photographie de droite montre un début de mélanisation. Barre = 1 mm



On voit par là que les lésions de type points blancs, du moins les plus avancées, provoquent des microperforations de la cuticule auxquelles l'organisme réagit par un phénomène de mélanisation, comme dans tout mécanisme de cicatrisation chez les Crustacés.

Il a été observé sur des géniteurs de l'écloserie du Nord stabulés à la SASV :

- Une augmentation significative de la présence et de l'importance des lésions avec le temps et la montée en température ($p=0,002$). Cette observation est similaire à celle effectuée à l'écloserie du Nord, où les lésions étaient apparues lors de la montée en température des bacs hébergeant les femelles.
- Une augmentation (non significative) de la présence et de l'importance des lésions au cours du cycle de mue ($B < C < D < D2$) ($p=0,13$).
- Un amincissement et une fragilisation nets de la cuticule au site des lésions les plus avancées.
- Aucun effet du sexe dans les conditions expérimentales : la sévérité des lésions est identique chez les mâles et chez les femelles. Dans les conditions de production de l'écloserie, où les femelles sont maintenues à une température plus élevée, l'atteinte des femelles était beaucoup plus grande.

II.3.3.2. Examens bactériologiques

Les examens bactériologiques ont été réalisés sur des crevettes présentant des points blancs, notamment sur des géniteurs de l'écloserie du Nord qui ont été transportés puis stabulés à la SASV. La difficulté a souvent été de trouver des animaux sans aucune lésion (témoins).

Au niveau de la flore bactérienne de l'hémolymphe, aucun résultat statistiquement significatif n'a été obtenu. On note toutefois que :

- La flore hétérotrophe totale de l'hémolymphe est plus élevée chez les animaux présentant des lésions que chez ceux qui n'en présentent pas ($p=0,17$).
- La flore présumée *Vibrionaceae* (sur TCBS) est faible, mais présente exclusivement chez les animaux avec des lésions.
- Le caractère " chitinase + " concerne une plus grande part de la flore hétérotrophe totale des individus présentant des lésions (environ 20% des souches chez les animaux avec lésions, contre moins de 10% chez les animaux indemnes).

Au niveau de la flore bactérienne épibiotique de la cuticule, la flore hétérotrophe totale est positivement corrélée à l'importance des lésions ($p<0,001$).

II.3.3.3. Recherche d'une chitinase chez les souches de Vibrio isolées d'épisodes du syndrome 93

Après 48 à 72 heures d'incubation, un large halo clair apparaît autour des colonies de *V. penaeicida* AM 101 et de *V. nigripulchritudo* AM 102, signalant la présence d'une chitinase sécrétée par ces colonies. Un halo clair (de moindre diamètre) apparaît autour des colonies de *V. alginolyticus* SF 5, signalant également la sécrétion d'une chitinase par cette souche. A l'opposé, les huit types de colonies isolées de l'eau du bassin n'ont pas présenté ce caractère après 7 jours d'incubation, et constituaient donc autant de témoins négatifs. Les essais obtenus avec la chitine commercialisée par Sigma ont donné des résultats en tous points similaires.

II.3.3.4. Utilisation de la chitine comme seule source de Carbone et d'Azote

Les souches *Vibrio alginolyticus* SF 5, *Vibrio penaeicida* AM 101 et *Vibrio nigripulchritudo* AM 102 sont capables de se développer avec de la chitine comme seule source de Carbone et d'Azote.

II.3.4 : Discussion

II.3.4.1. Nature des lésions

Les lésions cuticulaires qualifiées d'après leur aspect morphologique de " points noirs " et de " points blancs " montrent à l'observation un certain nombre d'aspects communs. Outre qu'ils sont présents sur les mêmes animaux, on observe que :

- Le point blanc apparaît comme une zone où la cuticule est désorganisée, souvent fragilisée. Son évolution semble centrifuge depuis un centre qui présente parfois des signes de rupture, se traduisant par l'apparition d'un point de mélanisation.
- Le point noir est de taille plus importante. Il semble entouré d'un halo présentant les mêmes caractéristiques que le point blanc. En son centre, la cuticule est absente, remplacée par un caillot mélanisé, ce qui constitue un mécanisme de défense de l'animal. On observe à sa proximité des points blancs de différentes tailles, à centre mélanisé ou non.

Il semble ainsi possible d'attribuer à ces deux lésions d'apparence différente une origine commune, et d'expliquer les différents aspects par des stades d'évolution différents.

La présence d'une flore épibiotique plus importante chez les animaux présentant des points blancs ne confirme pas son rôle étiologique, puisque celle-ci peut être secondaire, mais confirme le caractère externe des lésions.

II.3.4.2. Conséquences des lésions

La difficulté de trouver des crevettes sans lésion (témoin) entraîne un défaut de puissance statistique. Toutefois, des tendances ont pu être mises en évidence, notamment un effet possible sur la flore de l'hémolymphe, qui confirmerait le rôle de " portes d'entrée " de ces lésions.

Ces travaux ont par ailleurs permis de mettre en évidence la sécrétion d'une chitinase par plusieurs des *Vibrio* isolés au cours d'épisodes de syndrome 93, notamment *Vibrio penaeicida* souche AM 101, *Vibrio nigripulchritudo* souche AM 102 et *Vibrio alginolyticus* souche SF 5. La sécrétion d'une chitinase est également décrite chez 100% des isolats japonais de *Vibrio penaeicida* testés (Ishimaru *et al.*, 1995).

La capacité de ces souches à sécréter une chitinase et à se développer avec de la chitine comme seule source de C et de N est un élément intéressant. En effet :

- une chitinase peut constituer un des facteurs de virulence de ces souches, permettant aux bactéries de léser la cuticule des crevettes, et de réaliser ainsi une voie d'entrée du pathogène

dans l'hôte. Cette relation entre l'activité chitinase et la virulence a été démontrée par Muroga *et al.* (1994) dans le cas d'une vibriose larvaire chez le crabe *Portunus trituberculatus*. De prochains essais tenteront de montrer si ce caractère chitinase est lié à la virulence chez *Vibrio penaeicida* et *Vibrio nigripulchritudo*.

- La capacité d'utiliser la chitine comme substrat organique (et même en tant que seule source de C et de N) pourrait être un des éléments permettant d'expliquer la plus grande sévérité des pics de mortalité lorsque ceux-ci sont simultanés d'un pic de mue dans le bassin atteint,
- ce caractère pourrait également être mis à profit pour isoler des souches de *Vibrio penaeicida* ou de *Vibrio nigripulchritudo* de l'environnement d'élevage, puisque ces caractères ne sont pas très répandus chez les bactéries de cet environnement, comme le montrent les tests effectués sur les souches isolées de l'eau d'un bassin d'élevage.

II.3.5. : Synthèse et Conclusion

L'observation sur les mêmes animaux des deux types de lésions (points blancs et noirs), ainsi que de lésions de type "intermédiaire" permet d'envisager à ces lésions une étiologie et une pathogénie communes.

L'hypothèse consistant en une attaque de la cuticule par des germes chitinolytiques semble la plus probable, puisque notre travail confirme l'origine externe de la lésion. La pathogénie serait alors la suivante, après adhésion de germes chitinolytiques à la cuticule :

- L'action chitinasique est peu importante (activité exoenzymatique faible et / ou nombre limité de germes adhérant à la cuticule), provoquant une attaque modérée de la cuticule. Une petite lésion de type point blanc est alors observable.
- Dans une attaque plus profonde, la lésion engendrée crée une petite perforation de la cuticule, atteignant l'épithélium sous-cuticulaire. Il se forme une petite zone de mélanisation, visible seulement à la loupe binoculaire.
- Enfin, dans les cas les plus graves (souches à activité chitinasique très élevée, nombre de germes important adhérant à la cuticule ou présence d'autres facteurs de virulence entraînant une atteinte de l'épithélium sous-cuticulaire), la lésion cuticulaire provoquée est de plus grande taille, la zone de mélanisation en résultant est visible à l'œil nu. Les plus grosses lésions pourraient correspondre à la confluence de plusieurs lésions de plus petite taille.

Dans les deux cas, le halo observé correspondrait à une zone où l'épicuticule est intacte, mais le réseau chitino-protéique sous-jacent serait partiellement digéré par l'action chitinasique, expliquant la fragilisation observée de la cuticule à son niveau.

De plus, la similitude des points noirs avec des lésions comparables décrites chez d'autres Crustacés permet de leur envisager des causes et une pathogénie semblables. Ainsi, chez les animaux à cuticule épaisse (Crabe, Homard), les lésions évoluent d'un aspect externe érosif à des lésions plus profondes provoquant une mélanisation, parfois une nécrose qui traduisent l'atteinte des tissus sous-jacents.

L'étiologie attribuée à ces lésions cuticulaires chez de nombreux Crustacés d'élevage, ainsi qu'à des lésions comparables observées chez des Crustacés microscopiques est celle de micro-organismes ayant la capacité de digérer la chitine, principalement des bactéries, parfois des champignons. Cette hypothèse a également été évoquée pour les points blancs.

On peut donc, d'après ces différents éléments, considérer que les deux types de lésions correspondent à différentes gravités de lésions résultant d'une même pathogénie. L'étiologie serait (comme proposée par les différents auteurs) l'attaque de la cuticule par des micro-organismes chitinolytiques.

Les *Vibrio* pathogènes responsables des mortalités de crevettes en grossissement pourraient notamment causer ce type de lésion puisqu'ils sont pourvus d'exoenzymes chitinolytiques. Ces lésions pourraient de plus correspondre à des voies d'entrée du pathogène dans son hôte. La vérification de cette hypothèse demanderait de recourir à des crevettes indemnes de ce type de lésions, ce qui n'est pratiquement jamais observée en Nouvelle-Calédonie.

Les Crustacés disposent de mécanismes de réparations des plaies cuticulaires, ou de mécanismes d'autotomie lorsque des appendices sont atteints. La maladie responsable des lésions décrites ici n'est donc pas à issue fatale. Ces lésions peuvent par contre constituer des "portes d'entrée" pour des germes plus virulents et être ainsi à l'origine de la pénétration d'un germe susceptible de devenir septicémique.

De la même façon, la capacité de sécréter une exoenzyme chitinolytique peut constituer, pour un germe pathogène d'un Crustacé, un facteur de virulence pouvant contribuer à envahir l'organisme de l'hôte.

II.3.6. : Diagnostic différentiel avec les lésions du WSSV

Il apparaît donc que l'attaque bactérienne de la carapace peut se traduire dans les stades précoces, ou lors d'attaques bénignes, par un syndrome de points blancs sur la cuticule qui évoque les lésions causées par le baculovirus responsable du White Spot Syndrome. Ces lésions sont en effet très comparables chez l'animal vivant, en particulier sous certaines conditions d'éclairage. Il semble toutefois possible de réaliser un diagnostic différentiel de ces deux types de lésions par les observations suivantes :

- Dans l'attaque par des germes chitinolytiques, la lésion est d'abord externe, elle se traduit dans les lésions les plus grandes par un amincissement et une fragilisation localisés de la cuticule. La lésion est donc souvent plus visible sur la face externe de la cuticule. Il n'y a donc généralement pas, au stade où la confusion peut exister, d'atteinte interne de la cuticule. Toutefois, lorsque celle-ci existe, une zone de mélanisation apparaît. Aucune mortalité ne semble accompagner ces lésions.
- A l'opposé, dans la maladie provoquée par le WSBV, la lésion est interne, donc plus visible sur la face interne. En effet, elle correspond à un dépôt calcaire sur la face interne de la cuticule (Lightner, 1996). Elle ne s'accompagne donc jamais d'un amincissement de la cuticule, ni de mélanisation. Ces lésions s'accompagnent de plus d'une mortalité revêtant un caractère épizootique.

Chapitre III : Perspectives de lutte

III.1. Aspects zootechniques et zoosanitaires

Cette réflexion a pour base un document interne IFREMER (AQUACOP, 1979) intitulé « Définition et prévention du complexe pathologique d'aquaculture intensive ». Il donne, outre des éléments de gestion zoosanitaire quelques notions sur les relations hôte - pathogène. Le Syndrome 93 est analysé sous cet angle, et une discussion est faite sur la notion d'intensification dans la filière aquacole de Nouvelle-Calédonie.

L'objectif de cette réflexion n'est pas de condamner telle ou telle pratique ni de montrer du doigt les dérives par rapport aux préconisations, mais d'inviter chacun à une analyse raisonnée de son système de production, afin de déterminer les facteurs de risques qui lui sont propres. Une gestion zoosanitaire stricte comme elle est pratiquée dans d'autres élevages industriels paraît difficilement réalisable dans les conditions actuelles. Les travaux en cours (suivi épidémiologique de *V. penaeicida* présenté au paragraphe I.4) devront permettre de déterminer quels éléments de gestion sont jugés indispensables à l'égard du Syndrome 93, et à l'opposé, de déterminer quelles pratiques ne sont pas justifiées pour cette problématique immédiate.

L'intensification est définie comme un ensemble de pratiques visant à l'augmentation des rendements d'un système de production. Cette définition s'applique à tout système agricole, aquacole... Dans une certaine mesure, tout système de production contrôlé par l'action humaine subit une intensification, du fait de l'éloignement volontaire et dirigé par rapport au système "naturel". En effet, l'action de culture ou d'élevage se traduit au minimum par une "favorisation" des espèces d'intérêt, forcément au détriment d'autres espèces ; Au maximum, et c'est souvent l'objectif recherché, elle correspond à la mise en place de monocultures, où l'ensemble de l'effort porte à ce que la productivité (naturelle et / ou induite) n'affecte qu'une seule espèce. Ceci se traduit par des efforts visant l'accroissement de la production de l'espèce d'intérêt, comme par des efforts visant l'élimination (localisée) des autres espèces.

Les conséquences de l'élevage et de l'intensification du point de vue des relations hôte - pathogène ont été rappelées par Berthe (1995) : " Les concentrations animales rencontrées en élevage exacerbent les effets néfastes de nombreux agents pathogènes ; tandis que le confinement empêche la fuite devant le milieu hostile ". Vis à vis des agents pathogènes, : " le développement de l'élevage [les] précède et [les] révèle ".

Les impacts de l'intensification au niveau de l'espèce élevée et de ses agents pathogènes se traduiront donc par une fragilisation de l'équilibre espèce élevée - pathogènes. Cette notion est bien connue, pas seulement d'ailleurs pour les risques pathologiques, puisque les systèmes de culture intensive sont connus comme plus fragiles et sensibles que les systèmes de culture extensive.

Dans le cadre de l'aquaculture de crevettes pratiquée sur le Territoire, une courte analyse permettra de juger des pratiques ou des situations où il y a lieu de voir une certaine intensification, à l'égard des risques pathologiques. On verra que cette intensification devra être évaluée par rapport à un référentiel, qui sera selon les cas les schémas de production " semi-intensif sans aération ", et " semi-intensif intensifié avec aération ".

Les spécificités de l'intensification pour l'aquaculture sont précisées dans le document cité plus haut (AQUACOP, 1979) et dont des extraits sont présentés en annexe. Afin d'en faciliter la lecture, il convient de déterminer la nature du complexe pathologique qui a reçu le nom de " Syndrome 93 ", et de rappeler quelques règles qui régissent les relations hôte - pathogène.

III.1.1. Les principes des relations hôte - pathogène : éléments d'écologie microbienne

L'écologie microbienne définit par certains principes l'évolution des caractères de virulence d'un agent pathogène en fonction de la densité et de la sensibilité de son hôte. Elle établit notamment deux principes qui sont d'une part que les pathogènes ont une vitesse de génération et donc d'évolution très rapide, d'autre part que la présence constante d'hôtes sensibles tend à sélectionner les formes pathogènes. La relation hôte - pathogène aboutit ainsi à un équilibre entre le pouvoir pathogène et la capacité à infecter de nouveaux hôtes. Lorsque des circonstances aboutissent à ce que la population d'hôtes change (qualitativement ou quantitativement), cet équilibre est rompu. Autrement dit, l'adaptation d'un agent pathogène à un hôte présent de façon constante aboutit à un équilibre qui stabilise le caractère pathogène et qui ne sera perturbé que si une pression extérieure s'exerce sur le pathogène, ou si la densité ou la sensibilité de l'hôte est modifiée. Si ces règles ont été établies et sont parfaitement applicables à des parasites obligatoires (virus notamment), elles sont moins strictes mais également valables pour des maladies bactériennes, bien que l'agent pathogène puisse dans ce cas trouver son salut en dehors de son hôte.

Ainsi, et schématiquement, l'augmentation de la densité d'une espèce dans un écosystème donné se traduit non seulement par une augmentation conjointe de la densité de ses pathogènes, mais aussi par une augmentation du pouvoir pathogène de ces agents, dans la mesure où ceux-ci ont une vitesse d'évolution plus élevée que leurs hôtes. La présence permanente d'hôtes sensibles stabilise par la suite ce caractère pathogène.

Les moyens de lutte qui en découlent revêtent donc deux aspects dérivant des deux principes énoncés plus haut, et visent à rompre cet équilibre, dans un sens favorable à l'éleveur, c'est à dire au profit de l'hôte :

- Une action sur l'hôte : diminution des effectifs d'hôtes sensibles (dans l'espace par une moindre densité ou dans le temps par la pratique de vides sanitaires, de cultures tournantes...) ; augmentation de la résistance de l'hôte (vaccination chez les espèces où elle est possible, sélection génétique).
- Une action sur le pathogène, visant à l'éliminer ou à limiter ses effectifs (antibiothérapie, désinfection...). Le recours à l'antibiothérapie doit toutefois toujours prendre en compte les risques sanitaires inhérents aux résidus et aux antibiorésistances.

III.1.2. Le Syndrome 93 : comment considérer les pathogènes ?

Plusieurs points de réflexion peuvent venir apporter une réponse à cette question. S'il est vrai que certaines hypothèses doivent encore être levées (toxicité d'un bloom préparant le terrain à la vibriose ?), il n'en demeure pas moins que le Syndrome 93 doit d'ores et déjà être considéré comme une vibriose causée par *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000). Le pouvoir pathogène de ces souches les rapprocherait de souches pathogènes strictes, puisque les doses infectantes sont considérablement basses, et qu'elles peuvent à elles seules reproduire la maladie par des voies d'infections non invasives (baignade). Deux éléments complètent cette considération :

- Le premier, issu des résultats de l'étude de typage moléculaire des *Vibrio* spp. isolés des épisodes de mortalité (voir paragraphe I.4) est le fait que les souches de *Vibrio penaeicida* isolées des épisodes de mortalité observés en Nouvelle-Calédonie diffèrent très nettement des souches de la même espèce isolées au Japon sur *Marsupenaeus japonicus* démontre que ces

souches pathogènes n'ont pas une origine exogène, et que le Syndrome 93 n'est donc pas une pathologie importée.

De la même façon, les différences entre les souches de cette espèce isolées lors d'épisodes de mortalité ayant affecté des fermes distantes de quelques dizaines de kilomètres démontrent qu'il ne s'agit pas d'une unique souche pathogène clonale affectant "aveuglement" des élevages menés dans des conditions parfois très différentes (à la différence d'un événement épidémique ou épizootique de type grippe ou dengue par exemple). Enfin, on démontre que les différentes souches isolées sur les animaux moribonds au cours d'un même épisode de mortalité peuvent présenter des différences entre elles, appartenant parfois même à des espèces différentes. Il ressort donc de ces observations que ces souches pathogènes ont été sélectionnées puis entretenues (stabilisées) par l'élevage lui-même.

- Le second élément est la démonstration de l'existence de porteurs sains de *Vibrio penaeicida*, comme cela a été réalisé par les travaux expérimentaux de l'IFREMER-COP et confirmé en conditions d'élevage en Nouvelle-Calédonie (voir paragraphe I.3). Ce fait met en lumière l'importance que vont pouvoir revêtir les conditions dites favorisantes ou déclenchantes : ces animaux en équilibre instable pourront selon les cas basculer du côté des malades, ou demeurer du côté des animaux sains. A ce niveau joue également la variabilité individuelle de sensibilité au pathogène, sur laquelle une démarche de sélection génétique peut être exercée.

A la lumière de ces deux faits, il convient à notre avis d'aborder le Syndrome 93 en considérant les *Vibrio* impliqués comme des agents pathogènes dont le pouvoir pathogène très élevé exacerbe l'incidence, mais dont l'épidémiologie correspond à celle d'agents opportunistes, comme le démontre la très grande part jouée par les conditions environnementales dans le déclenchement de la maladie. Il y a donc lieu de qualifier le Syndrome 93 de "complexe pathologique d'élevage intensif". Par ailleurs, les travaux récents tendent à démontrer que les virus considérés comme parmi les plus virulents peuvent également, en regard de leur épidémiologie, être considérés comme des agents opportunistes, soulignant le rôle majeur des conditions d'élevage. Ainsi, Tsai *et al.* (1999) ont montré qu'un élevage dans lequel le virus WSSV était enzootique n'était pas nécessairement affecté par ce virus, en l'absence de conditions stressantes pour les animaux.

“ La question est donc de savoir pourquoi de paisibles germes de l’environnement, capables de se développer sans le secours d’aucune cellule étrangère, se mettent tout à coup à envahir un organisme et à y provoquer des troubles plus ou moins importants. (...) Des bactéries réputées en d’autres lieux comme inoffensives peuvent devenir pathogènes sous l’action de facteurs du milieu, et le contact avec l’hôte peut de lui-même créer les conditions requises pour rendre les bactéries agressives ! (...) L’effet pathogène est en quelque sorte la rupture d’un équilibre où l’hôte perd du terrain face à son antagoniste. ” (J. Pelmont, 1993).

III.1.3. Les voies d’entrée d’un agent pathogène dans un élevage

Un aperçu des possibles voies d’entrée de pathogènes dans un bassin d’élevage permet d’entrevoir les précautions sanitaires qui peuvent être envisagées. La voie d’entrée d’un pathogène dans un bassin n’est pas forcément l’eau d’entrée comme cela semble être le cas pour le Syndrome 93 (voir paragraphes I.3 et I.4). Pour certains pathogènes, une transmission verticale (directe ou indirecte) a été montrée. La transmission horizontale peut, elle aussi, prendre des voies inattendues : hormis le personnel et le matériel de la ferme qui travaille ou sert sur plusieurs bassins, les oiseaux ont pu être impliqués, les compétiteurs (principalement Crustacés), les percolations entre bassins voisins, l’aliment cru, les aérosols eux-mêmes peuvent jouer ce rôle.

Même dans le cas où le pathogène est véhiculé par l’eau d’adduction de la ferme, la dose ainsi introduite dans le bassin n’est presque jamais d’emblée infectante, et la maladie ne se déclarera qu’à la condition d’un déséquilibre dans la relation hôte - pathogène. De plus, cette voie d’entrée majoritaire n’exclut pas qu’il en existe d’autres, annexes.

Ces éléments démontrent que la logique voudrait que l’on considère comme unité de production la ferme entière et non le bassin. C’est d’ailleurs ce qui est considéré dans les écloséries, où la mise en assec et la désinfection concernent l’ensemble de la structure, et non quelques bacs d’élevage attendant un nouveau remplissage.

III.1.5. Les faces cachées de l’intensification : seulement une histoire de densité ?

Ne doit-on rechercher la signature d’une pratique d’intensification que dans l’augmentation des densités moyennes d’ensemencement par rapport aux normes préconisées pour chaque type de système de production ? C’est certes cet aspect qui est l’un des plus visibles, et celui sur lequel il semble le plus facile de pouvoir jouer de façon volontaire. C’est pourtant un seul des

nombreux éléments qui conduisent à un niveau critique d'intensification d'une filière d'élevage. Par exemple, l'augmentation des quantités d'aliments distribuées dans un bassin, visant à une augmentation des vitesses de croissance est une pratique d'intensification au sens strict : elle vise à accroître la productivité du système.

- A la lumière du paragraphe précédent, il paraît évident qu'une ferme de grossissement ne pratique pas de "vide sanitaire". On doit voir là un phénomène d'intensification. Il en résulte qu'en plus des risques sanitaires liés à la pratique d'une monoculture s'ajoutent ceux liés à son caractère continu. La présence continue de l'hôte sur un site entraîne nécessairement la permanence de ses pathogènes. Notons que les pratiques agraires ont depuis longtemps intégré ces données, et utilisent des cultures tournantes. (Ces dernières ont, il est vrai, d'autres justifications que sanitaires).

- Certaines contraintes ont jusqu'à maintenant obligé à (ou permis de) considérer le bassin comme unité de production, et non la ferme comme il serait souhaitable. Il est évident que dans cette approche minimaliste, pour ne pas tomber dans les risques des systèmes continus, un vide sanitaire de cette unité minimale doit être pratiqué. Il consiste généralement en la mise à sec du bassin dans son intégralité. L'exposition aux UV et la dessiccation assurent la meilleure stérilisation qui soit envisageable sur ces grandes surfaces. Le moindre mal est le traitement de toutes les flaques résiduelles à l'aide d'un produit antiseptique (généralement de l'hypochlorite de Na ou de Ca). Chaque zone humide non désinfectée peut constituer un réservoir de pathogènes (et doit être considéré comme tel), qui ferait retomber cette unité de production dans le schéma d'un système continu.

- Les exemples ne manquent pas, qu'ils soient empruntés à l'Amérique Latine ou à l'Asie du Sud-Est d'une intensification que l'on peut qualifier "de voisinage" : la concentration des fermes à proximité les unes des autres entraîne inévitablement un pompage et une utilisation d'eaux qui ont déjà pu "traverser" ou "servir à" une ou plusieurs fermes voisines, situées en amont de la circulation générale de ces eaux. Cet aspect peut aussi être retrouvé en Nouvelle-Calédonie, où certaines fermes re-pompent avec certitude une partie de leurs propres effluents, voire ceux d'une ferme voisine. Du point de vue du pathogène, cela conduit à un "passage en série" sur leur hôte, qui ne peut que conduire à l'exacerbation des caractères de virulence. On devine que dans ce cas, la logique voudrait que l'unité "sanitaire" de production

considérée soit une région de production complète ! Il est intéressant de noter que cette démarche a été mise en œuvre à Belize : Ce pays qui dispose d'une aquaculture de crevettes comparable à celle qui existe en Nouvelle-Calédonie (600 ha de bassins et 2000 tonnes de production annuelle de *Litopenaeus vannamei*) a choisi de pratiquer un assec national de toutes les fermes (canaux compris) au cours des mois de Décembre 1996 et Janvier 1997, pour lutter contre le virus Taura. Cette pratique qui a permis l'éradication du virus a été renouvelée en Février 1998. (Rosenberry, 1997 et 1998).

- La densité (en tant que promiscuité favorisant la contagion) ne joue pas forcément un rôle prépondérant dans l'équilibre hôte - pathogène, surtout dans le cas d'un agent opportuniste. En effet, des systèmes de production ont pu être définis qui permettent de maintenir cet équilibre en assurant d'une part une pression suffisante sur le pathogène, d'autre part un confort suffisant à l'animal. Ainsi et à titre d'exemple, les taux de renouvellements sont adaptés à la charge du bassin et produisent notamment une dilution de la " charge en pathogènes ", ne permettant pas, dans l'idéal, à cette charge d'atteindre les seuils des doses infectantes. De même, une puissance d'aération adaptée à la charge en élevage permet à l'animal de se maintenir à un niveau de normoxie favorable à l'ensemble de ses fonctions biologiques et immunologiques. Ces exemples n'excluent bien sûr pas que d'autres mécanismes que ceux cités (connus ou non) soient mis en jeu par ces pratiques culturelles. On voit par ces deux exemples qu'une mauvaise adéquation entre les pratiques culturelles et la densité ou la charge en élevage constituent au sens défini plus haut une intensification du système d'élevage. La notion d'intensification nécessite donc la comparaison à un référentiel pour chaque type de système de production. Ainsi, un bassin insuffisamment aéré ou renouvelé subira les effets de l'intensification à des densités plus faibles qu'un bassin disposant d'une aération et d'un renouvellement suffisants. De même, dans toute pratique ou tout état du système provoquant un stress pour l'animal, on retrouvera les mêmes effets que dans l'intensification, puisqu'elle provoque un déséquilibre de la relation hôte - pathogène. Il n'y a là aucun critère de gestion zoosanitaire à déduire, mais des pratiques zootechniques qui pourront jouer favorablement sur cet équilibre hôte - pathogène.

III.1.6. Gestion du risque pathologique en élevage.

La première approche, la plus ancienne, est celle des cultures tournantes, comme cela a déjà été mentionné pour l'agriculture. Il serait mensonger de leur attribuer une cause sanitaire en

premier lieu, puisque ces pratiques visent d'abord à un respect de la fertilité des terres agricoles. Vue sous un angle sanitaire, cette pratique a pourtant comme énorme avantage de ne pas constituer un système continu. Elle consiste à cultiver alternativement deux ou trois espèces suffisamment éloignées les unes des autres pour que chacune ne soit pas *a priori* sensible aux agents pathogènes de chacune des autres. Pour l'aquaculture, cette démarche reviendrait à élever alternativement des Poissons et des Crustacés, par exemple. Chaque élevage d'une espèce peut alors être considéré comme un vide sanitaire à l'égard des autres espèces.

Un des principes de gestion zoosanitaire les plus courants et les plus efficaces consiste en l'isolement des animaux de différents âges et stades. Ce principe revêt deux aspects :

- **Un isolement temporel** : une des pratiques les plus rationnelles et les plus utilisées dans des installations destinées à la monoculture est celle de la “ conduite en bandes ”, le fameux “ all-in / all-out ” des anglo-saxons. Elle consiste en un synchronisme étroit entre les élevages au sein d'une même unité. C'est cette pratique également qui tend à être appliquée dans les écloséries de crevettes du Territoire. Comme nous l'avons mentionné plus haut, cette pratique, pour être entièrement accomplie dans le cadre des fermes de grossissement, consisterait dans l'assèchement simultané d'une ferme complète *a minima*, parfois d'une région de production entière si l'agencement et l'hydrographie le rendent nécessaire.
- **Un isolement géographique** : On rejoint là les problèmes d'interactions entre différentes fermes de grossissement déjà mentionné plus haut, mais aussi entre écloséries et fermes de grossissement. Aucun site de production ne devrait, dans l'idéal, abriter ces deux phases du cycle d'élevage. En effet, dans le cas d'une maladie à transmission verticale sur des populations en captivité (sans recours à des géniteurs sauvages) on se retrouve dans le cadre déjà évoqué plus haut d'un passage en série du pathogène sur son hôte, comme dans une monoculture en continu. Dans le cas où cet isolement géographique ne peut être obtenu, la disposition des différentes structures par rapport aux vecteurs passifs (vents dominants, circulation de l'eau) devra s'efforcer d'intégrer le principe de la “ marche en avant ”, les zones les plus sensibles et les plus propres (éclosérie) devant être en amont des zones les plus contaminantes (bassins de grossissement, zone de pêche...).

III.1.7. Applications à la pénéculture calédonienne : les limites du modèle... et un peu d'autocritique...

Le principe des cultures tournantes, bien que séduisant, se heurte en élevage à une contrainte majeure : l'élevage dans les mêmes structures (bassins en terre ici) de deux ou trois espèces phylogénétiquement distantes, et qui ont donc des exigences culturales parfois très différentes. Dans l'état des connaissances, rien (hormis le tilapia ?!) ne peut être envisagé dans cette voie pour notre problématique.

Les principes majeurs consistent dans l'isolement des différents stades et âges. Certains peuvent apparaître inutiles dans le cadre de l'aquaculture calédonienne, d'autres irréalisables. Il faut toutefois conserver en mémoire que chacun a sa raison d'être, a eu l'occasion dans le cadre d'autres élevages de démontrer son utilité, enfin que les contraintes liées à ce type de mesure de gestion apparaîtraient beaucoup plus fortes si elles devaient un jour être pratiquées pour des raisons curatives (" Mieux vaut prévenir que guérir ").

- Dans le cadre du Syndrome 93, l'absence de transmission verticale de *Vibrio penaeicida* et d'expression de ce pouvoir pathogène sur les stades larvaires et postlarvaires ont été démontrées (voir paragraphes I.3 et II.1). Ainsi, l'isolement géographique des écloséries par rapport aux fermes de grossissement apparaît comme une contrainte inutile ajoutée au système. Néanmoins, dans le cas de la construction de nouvelles structures de production, cette préconisation devrait être prise en compte.

- Quant à considérer la ferme comme unité de production et non le bassin, cela permettrait une véritable conduite en bandes, et de véritables vides sanitaires, consistant en un assec complet, canaux compris. Le nombre de fermes de grossissement du Territoire semble encore insuffisant pour pouvoir mettre en application ce principe : l'amélioration attendue ne serait peut-être pas à la hauteur des contraintes que cette pratique entraînerait au niveau de l'atelier de conditionnement, des écloséries et des fermes elles-mêmes (capacités de pompage, stockage et distribution d'aliments... en fin de cycle). Cette idée doit néanmoins demeurer omniprésente au sein de la filière, et éventuellement étudiée en termes technico-économiques, et à une moindre échelle dans la gestion des fermes. La pêche simultanée de plusieurs bassins voisins facilitera les assecs. Si ces bassins sont situés à une extrémité de la ferme, l'assèchement du canal d'adduction d'eau à leur niveau apparaît souhaitable.

Dans la situation actuelle, la gestion zoosanitaire, si elle est un souci permanent des écloseries, est quasi inexistante dans les fermes de grossissement et la partie amont des écloseries (production des géniteurs). Il a été dit que le fait de considérer chaque bassin comme une unité de production constituait une vision réductrice et minimaliste. Une fois cette limitation acceptée, il convient de respecter au maximum toutes les précautions sanitaires qui peuvent l'être.

III.2. Médication, "vaccination" et immunostimulation des crevettes en élevage

L'utilisation de techniques médicamenteuses permettant de limiter l'impact du Syndrome 93 dans les élevages de grossissement a été rapidement envisagée. Bien que la pénéculture calédonienne ne représente qu'un volume relativement faible, de nombreux fournisseurs ont proposés différents produits supposés apporter une amélioration des survies dans les élevages affectés. La Station d'Aquaculture de Saint Vincent a dû assurer un rôle de modérateur face à des présentations commerciales plus ou moins trompeuses.

Les approches thérapeutiques peuvent être basées sur l'utilisation d'antibiotiques à l'encontre du pathogène ou sur une augmentation de la résistance des animaux au pathogène.

Des essais ont dans un premier temps été réalisés avec des antibiotiques, solution à court terme envisagée initialement, n'ont pas été concluants et présentent de plus des risques élevés (antibiorésistance, résidus, problèmes d'image de marque du produit). Ces essais n'ont apporté aucune amélioration de la survie. Un suivi des concentrations sériques de l'antibiotique en HPLC (réalisé en collaboration avec l'ORSTOM, données non publiées) montre que la chute de température s'accompagne d'un arrêt de la consommation de l'aliment médicamenteux. Ainsi, les concentrations thérapeutiques ne sont plus atteintes dans la crevette dès la baisse des températures, coïncidant avec le développement du *Vibrio* pathogène.

D'autres essais utilisant des substances commerciales à visée immunostimulante (β -glucans). Ces produits sont largement proposés en aquaculture de crevettes par analogie avec des effets immunostimulants réellement observés chez les Poissons (Skjermo *et al.*, 1995 ; Itami *et al.*, 1996 a). Des essais menés avec ces produits en bassins de grossissement ont été menés sans succès.

Le système immunitaire des Arthropodes ne permet pas non plus la vaccination *sensu stricto*. En effet, l'immunité n'est pas spécifique d'une part, aucune mémoire immunitaire n'existe d'autre part. Toutefois, le terme de "vaccin" est largement utilisé commercialement pour désigner l'utilisation de bactéries tuées dans un but de renforcement de l'immunité non spécifique, *i.e.* d'immunostimulation. En effet, le système pro-phénoloxdase est stimulé par le lipopolysaccharide de la paroi des bactéries Gram négative (Soderhäll et Häll, 1984). De plus,

la stimulation de l'activité phagocytaire par l'injection de corps bactériens dans l'hémolymphe entraîne une augmentation du nombre d'hémocytes circulants (Hauton *et al.*, 1997, Goarant et Boglio, 2000). Ainsi, un effet de protection relative contre la vibriose a été obtenu par Itami *et al.* (1989) et Teunissen *et al.* (1998). Toutefois, ces auteurs travaillaient sur des postlarves et exposaient ces animaux aux corps bactériens tués par balnéation. Cette technique n'est bien sûr pas applicable pour des crevettes juvéniles en bassins de grossissement. Toutefois, la voie orale est préconisée commercialement sous forme d'aliment médicamenteux par les firmes vendant ces produits, bien qu'aucun effet n'ait pu être mis en évidence lorsque cette voie d'administration est utilisée (Itami *et al.*, 1992b ; Alabi *et al.*, 1999 ; Goarant et Boglio, 2000). Des essais de préparations commercialisées sous une appellation « vaccinale » ont toutefois été menés en bassins de grossissement expérimentaux, qui n'ont pas permis de montrer une quelconque amélioration de la survie.

III.3. Sélection génétique d'animaux plus résistants

Présentation à congrès n° 2

La sélection de lignées résistantes aux pathologies est un des axes de recherche privilégiés dans l'étude de nombreuses maladies chez les animaux, aussi bien que chez les végétaux. Ainsi, dans le domaine de l'aquaculture ont été sélectionnés notamment chez les Salmonidés des animaux à résistance accrue à certaines pathologies virales ou bactériennes (Sövényi *et al.*, 1988 ; Chevassus et Dorson, 1990 ; Gjedrem *et al.*, 1991 ; Fjalestad *et al.*, 1993 ; Kirpichnikov *et al.*, 1993). Chez les crevettes Pénéides une souche de *Litopenaeus stylirostris* résistante au virus IHHN a également été sélectionnée (souche "AQUACOP SPR 43", Weppe *et al.*, 1992).

De la façon la plus simple et la plus empirique, souvent au détriment de la variabilité génétique au sein de la population, cette sélection peut être envisagée par le croisement entre eux ("inbreeding") d'individus ayant survécu à une pression de sélection suffisante, c'est à dire, dans le domaine des pathologies, souvent létale pour une proportion relativement importante de la population. Ce mode de sélection peut conduire plus ou moins rapidement à la sélection d'individus ayant une résistance génétique relative ou totale à la pathologie étudiée. Ainsi, c'est probablement ce mode de sélection qui a conduit à l'isolement de la souche *L. stylirostris* "AQUACOP SPR 43" résistante au virus IHHN. Embury et Hayford (1925, cité par Chevassus et Dorson, 1990), en sélectionnant comme géniteurs les truites survivantes à la furonculose sont passés en trois générations de 2 % à 69 % de survie à 6 mois.

Ce mode de sélection repose sur le caractère génétique de la résistance étudiée, que traduit ensuite son caractère plus ou moins héritable, c'est à dire transmissible à la descendance (l'héritabilité, souvent écrite h^2 , représente la part de la valeur génétique de reproducteurs sélectionnés qui sera transmise à leur descendance. Elle varie de 0 à 1 (ou 0 à 100 %). Plus simplement, elle peut être assimilée au pourcentage de chances que la caractéristique soit transmise). Ainsi, Gjedrem *et al.* (1991) montrent que l'héritabilité de la résistance à la furonculose chez le saumon atlantique peut être estimée à 0,48 (soit 48 %), ce qui constitue une valeur relativement élevée. Ceci implique dans le cadre des pathologies, souvent multifactorielles, la nécessité d'une pression de sélection relativement importante.

C'est avec cet arrière-plan qu'a été envisagée la sélection d'animaux résistants au Syndrome 93 à la Station d'Aquaculture de Saint-Vincent.

Cette expérimentation ne constitue pas un programme de sélection génétique, qui nécessiterait un protocole beaucoup plus lourd et un nombre plus élevé d'unités expérimentales, mais une approche relativement simple qu'il nous a été possible d'envisager avec le nombre limité de bassins disponibles. Cette approche simplifiée devait permettre d'avoir un aperçu quant à la possibilité d'entreprendre un réel programme de sélection génétique sur ce critère. En effet, un véritable programme de sélection combinée reposant sur l'étude du caractère recherché chez un nombre important de familles nécessitera l'installation d'un nombre important d'unités expérimentales (bassins de petite taille, bacs...).

Elle peut néanmoins dans son concept être rapprochée de la sélection individuelle ou massale : la réponse à la même pression de sélection des apparentés (fratries des individus survivants) n'est pas connue. A ce titre, elle ne sera efficace que si le caractère recherché (résistance au Syndrome 93) est fortement héritable ($\geq 40\%$).

III.3.1. Matériels et méthodes :

Au cours de la saison froide 1996, six bassins de la SASV 2 ont étéensemencés simultanément à environ 20 post-larves par mètre carré et pêchés 7 mois plus tard. Trois de ces sept bassins étaientensemencés avec des post-larves issues de géniteurs ayant survécu à des épisodes de Syndrome 93 (dits "RS93"), alors que les quatre autres (dits "normaux") étaientensemencés avec des post-larves issues de géniteurs élevés dans des conditions classiques d'élevage géniteurs, donc classiquement très peu soumis au Syndrome 93, du fait de conditions d'élevage particulièrement extensives.

Les élevages larvaires et acclimatation ont été menés simultanément et dans les mêmes conditions. Les géniteurs de la " lignée RS93 " ont été obtenus en récupérant lors d'une pêche partielle d'une ferme de production des crevettes de 20 g ayant survécu à des pics de mortalité dus au Syndrome 93 survenus sur ce bassin. La survie du bassin d'où sont issus les géniteurs a été de 29 %. Ces animaux ont été placés en bassin géniteurs pendant deux mois et demi afin qu'ils atteignent une taille et un poids compatibles avec la maturité sexuelle. La lignée dite "RS 93" est constituée d'un mélange de pontes issues de 37 femelles et 38 mâles de ce lot, afin de ne pas trop affecter la variabilité génétique au sein de cette lignée. Le calcul montre que ces effectifs de géniteurs permettent de conserver plus de 99 % de la variabilité génétique présente

dans le stock parental. Les géniteurs dont sont issus les animaux de la “ lignée normale ” témoin proviennent d'un élevage géniteurs classique.

Des élevages comparatifs entre ces deux lignées ont été menés dans les bassins de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent : les bassins 2 à 7 de la SASV 2 ont été ensemencés le 12/03/96 avec des P14/16 issues de la même production d'écloserie. Les bassins 6 et 7 reçoivent des post-larves "RS93". Les autres bassins (2, 3, 4 et 5) reçoivent des post-larves issues de géniteurs "normaux".

Ces sept élevages ont été gérés selon le mode semi-intensif sans aération, avec des taux de renouvellement différents. Les particularités de gestion de chaque bassin sont présentées dans le tableau 5 ci dessous.

Tableau 5 : Conditions des élevages comparant les postlarves issues de géniteurs ayant survécu au Syndrome 93 aux postlarves issues de géniteurs non sélectionnés.

Bassin	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7
lignée	Normal	Normal	Normal	Normal	RS 93	RS 93
densité	20,1	20,3	19,3	19,4	20,4	19,7
Renouvellement quotidien	10 %	11 %	17 %	21 %	17 %	22 %

III.3.2. Résultats :

Ces bassins ont traversé la saison froide et subi un épisode de mortalité important (du 31/05/96 au 18/06/96) et plusieurs épisodes de mortalité plus discrète.

En fonction de la gestion zootechnique pratiquée, les bassins comparables sur le critère étudié de survie sont au nombre de 4, comparables 2 à 2. Ainsi peuvent être comparés les bassins 4 et 5 avec les bassins 6 et 7. Ces résultats sont présentés dans le tableau 6 (les autres survies données pour mémoire).

Tableau 6 : Résultats des élevages expérimentaux avec la descendance d'animaux ayant survécu au Syndrome 93, comparés à des crevettes non sélectionnées.

	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7
lignée	Normal	Normal	Normal	Normal	RS 93	RS 93
survie	23,8%	29,3%	26,5%	36,2%	34,8%	41,8%
PM final	27,8 g	26,4 g	26,8 g	25,6 g	25,9 g	23,4 g
Indice de Conversion	2,98	2,66	3,01	2,6	2,44	2,49
Renouvellement	10 %	11 %	17 %	21 %	17 %	22 %

Le plan d'ensemencement des bassins comparatifs ne permet pas de réaliser de comparaisons statistiques. Toutefois, en considérant uniquement les 4 élevages qui peuvent être réellement comparés deux à deux, les survies moyennes en 209 jours d'élevage sont de **31,3 % pour la lignée "Normale"** et de **38,3 % pour la lignée "RS 93"**.

Les indices de conversion sont par ailleurs meilleurs pour les bassins dont les survies sont améliorées. Les poids moyens finaux sont proches : cette sélection ne semble pas s'être faite au détriment du potentiel de croissance des animaux.

III.3.3. Discussion et perspectives :

Les bassins ensemencés avec des animaux de la lignée "RS93" ont obtenu des survies plus élevées que les bassins ensemencés avec des animaux de la lignée "normale". Cette amélioration de la survie estimée est en moyenne de 7 points sur ces deux comparaisons.

Cet écart, s'il ne permet pas de conclure formellement et statistiquement à une amélioration de la survie de cet ordre de grandeur, suggère que le mode de sélection testé permet effectivement de sélectionner des animaux ayant une résistance relative au Syndrome 93, et que cette résistance a une héritabilité significative. De plus, cette sélection ne semble pas s'être faite au détriment du potentiel de croissance des animaux.

Toutefois, ce mode de sélection est contraignant et peu reproductible sur le plan zootechnique, les générations de géniteurs arrivant à l'âge de 5 à 6 mois à un poids moyen nettement inférieur à celui des géniteurs élevés dans les conditions classiques. L'utilisation d'un challenge infectieux suffisamment létal, qui pourrait être appliqué aux géniteurs quelques temps avant l'entrée en maturation permettrait d'améliorer et de standardiser cette méthode de sélection qui semble prometteuse. Cet axe est actuellement développé dans le programme de sélection

génétique mené par l'IFREMER-COP à Tahiti, et sera mis en place en Nouvelle-Calédonie dans le cadre de la mise en place d'un programme de sélection génétique.

Conclusions et perspectives

Notre travail a consisté, après une participation aux phases initiales de description du Syndrome 93 et de recherche de l'agent étiologique, en l'étude de l'épidémiologie de cet agent pathogène (ainsi que d'autres souches et espèces de *Vibrio* pathogènes identifiés au cours de ces phases initiales) et des travaux préliminaires sur la pathogénicité de ces souches. Du fait du rôle de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent dans l'assistance au développement de la filière de production de crevettes marines, nous avons envisagé un certain nombre de solutions pratiques qui permettraient de limiter l'impact biotechnique et donc financier de cette pathologie.

Dans un premier temps, notre programme de recherche ne disposait d'aucun outil diagnostique pour les souches de *Vibrio* pathogènes identifiées. L'approche épidémiologique s'est donc appuyé sur une technique de typage performante et rapide, l'amplification de fragments du génome à l'aide d'amorces arbitraires par la technique d'Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (Welsh et McClelland, 1990). Cette technique a été utilisée avec succès dans différents genres bactériens pour discriminer des isolats à un niveau infra spécifique (Welsh *et al.*, 1992 ; Perolat *et al.*, 1994 ; Ralph *et al.*, 1993 ; Martinez *et al.*, 1994).

Dans notre travail, ce pouvoir discriminant élevé nous a en effet permis une **identification** des souches au niveau de l'espèce grâce à la comparaison de leurs profils électrophorétiques avec ceux des souches de référence des espèces concernées, et de **caractériser différents types** au sein de la même espèce *Vibrio penaeicida*. Ce type de travail n'avait jamais été mené, à notre connaissance, sur des souches pathologiques en pénéculture. Les types distingués ont pu être liés à des données épidémiologiques d'importance, et définis comme correspondant à des origines géographiques distinctes. Ces types géographiques ou **topotypes** nous ont permis d'émettre une hypothèse sur **l'origine hydrique de la contamination** des élevages et de montrer le **caractère enzootique** de cette affection.

Des topotypes avaient déjà pu être distingués au sein du genre *Vibrio* par différents auteurs, et à l'aide de différentes techniques. Ainsi, dans les espèces *V. vulnificus* (Høi *et al.*, 1997) et *V. anguillarum* (Kühn *et al.*, 1996), des souches d'origines géographiques différentes sont distinguées, mais ces études incluait des souches prélevées sur des échelles spatiales

beaucoup plus grandes. Les topotypes distingués dans notre travail correspondent à des zones distantes d'une cinquantaine de kilomètres seulement.

L'approche de notre travail était purement épidémiologique et originale. Trente cinq des cinquante trois isolats ont été intégrés dans la sélection de souches étudiées sur la seule base de leur importance clinique, puisqu'elles correspondaient à des souches septicémiques isolées de cultures monomorphes d'hémolymphes de crevettes moribondes au cours d'épisodes de Syndrome 93. Les dix huit autres souches étaient déjà partiellement documentées par des études de ribotypage (Costa *et al.*, 1998 b).

Dans le cas de ces souches déjà documentées, il convient de noter que nos résultats de typage par AP-PCR sont **en accord avec les résultats obtenus en ribotypage**. Il convient également de noter que la comparaison des profils électrophorétiques des souches calédoniennes et japonaises de *V. penaeicida* ont permis de montrer leur appartenance à la même espèce, **rapprochement que le ribotypage n'avait pas permis** (Costa *et al.*, 1998 b). Les différences de profils électrophorétiques observées tant avec la technique d'AP-PCR qu'avec la technique de ribotypage (qui étudie une région conservée du génome, Grimont et Grimont, 1986) **permettent d'exclure une origine exotique** (d'importation japonaise) aux souches calédoniennes de *V. penaeicida*.

Notre étude a également permis de confirmer **l'importance épidémiologique** de cette espèce bactérienne dans le Syndrome 93. L'implication d'une **autre espèce**, *V. nigripulchritudo*, a pu être précisée par notre étude, qui montre qu'elle était jusqu'alors **limitée sur le plan géographique** à une zone d'élevage. Il s'agit à notre connaissance de la première description de l'implication de cette espèce dans un contexte de pathologie aquacole. Des préconisations ont été édictées afin de **limiter les risques de son extension**. L'implication minoritaire d'autres espèces dans les épisodes de mortalité du Syndrome 93 a également été montrée. Ce fait démontre **l'importance des facteurs environnementaux** et des **pratiques zootechniques** dans la survenue de cette pathologie.

Les données épidémiologiques déduites de notre étude nous ont également permis d'établir que la **contamination des bassins d'élevage par *V. penaeicida* se faisait par l'eau de pompage** des fermes. Ce résultat a été **confirmé par un suivi épidémiologique** de *V. penaeicida*.

La mise au point de sondes spécifiques à partir des fragments caractéristiques, telle que réalisée par Letocart *et al.* (1997) sur des leptospires pathogènes a été envisagée. Le développement d'un couple d'amorces spécifiques de *V. penaeicida* par Saulnier *et al.* (2000) nous a finalement conduit à abandonner cette possibilité.

La mise au point d'un couple d'amorces spécifiques de *V. penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000) a donc permis d'entreprendre un suivi épidémiologique vaste de ce pathogène par la technique d'amplification génique (PCR).

Les **résultats préliminaires** de ce travail actuellement en cours **confirment** la contamination des élevages par **l'eau de pompage**.

Ce travail devrait permettre de mettre en évidence la dynamique de *V. penaeicida* dans les élevages. Un certain nombre de conseils de gestion zoosanitaire du Syndrome 93 pourraient en être déduits, permettant de réduire son impact sur les élevages.

A la suite de ce travail, et afin de préciser **l'écologie** de *V. penaeicida* dans **l'environnement d'élevage**, des travaux sur l'écologie de ce *Vibrio* pourraient être entrepris.

Ainsi, des travaux d'écologie microbienne réalisés sur *V. parahaemolyticus* en Baie de Chesapeake (aux États-Unis) notamment ont permis de préciser son cycle annuel et ses modes de survie et de dispersion (Kaneko et Colwell, 1973 ; Colwell, 1983). Ainsi, il a notamment été montré que *V. parahaemolyticus* était fréquemment associé aux particules de chitine ou aux Arthropodes vivants notamment aux Copépodes (Kaneko et Colwell, 1975 ; Venkateswaran *et al.*, 1989), y compris dans les eaux douces (Sarkar *et al.*, 1983 et 1985). Le même type d'association avec les Crustacés planctoniques ou les débris de chitine est par ailleurs connu chez *V. cholerae* (Huq *et al.*, 1983). Un cycle annuel de la biologie de ce *Vibrio* a ainsi pu être précisé dans cet environnement de la baie de Chesapeake (Colwell, 1983 ; Kaneko et Colwell, 1978). Les comptages de *V. parahaemolyticus* y sont corrélés avec la température et cette bactérie n'est pas détectée dans la colonne d'eau pendant les mois d'hiver. Néanmoins, elle survit en petits nombres dans les sédiments. La remise en suspension du sédiment par les crues du printemps, ainsi que par les actions conjuguées du vent et de la marée, provoquent la remise en suspension des *V. parahaemolyticus*, qui prolifèrent après association avec le plancton et les particules de chitine. L'adsorption de *V. parahaemolyticus* sur le plancton a d'ailleurs une efficacité accrue en conditions de salinité estuariennes. Les comptages sont maximaux pendant les mois d'été (Juin à Août) tant dans l'eau, les sédiments que le plancton, et atteignent environ 10^7 à 10^8 CFU / g de plancton humide. *V. parahaemolyticus* participe pendant l'été à la minéralisation des matières en suspension, notamment la chitine et le phytoplancton sénescents. Une campagne océanologique a permis de montrer que *V. parahaemolyticus* est absent du sédiment et de la colonne d'eau au large de cette baie de Chesapeake. Cette bactérie est donc

considérée comme un organisme estuarien, non compétitif dans des conditions de haute salinité, de basse température, de faible matières en suspension, ou de hautes pressions. *V. parahaemolyticus* est donc une bactérie qui assure une fonction dans l'écologie globale de la baie de Chesapeake. D'autres études ont montré que l'hémolymph de crabes sains pouvait héberger des *V. parahaemolyticus*. Les auteurs en concluent que, dans les environnements estuariens, *V. parahaemolyticus* est naturellement associé aux crustacés.

L'étude de l'écologie de *V. cholerae* a également permis de déterminer des éléments climatiques liés à l'incidence du choléra. Colwell et Huq (1999) ont étudiés différents paramètres physico-chimiques ou biologiques des eaux côtières en Inde et au Bangladesh en relation avec l'incidence du choléra. Ils ont ainsi pu proposer un certain nombre de critères de prédiction des épidémies de cette maladie à partir de paramètres comme la température de surface de l'eau de mer, la chlorophylle et le zooplancton. De même, ils expliquent les incidences variables de cette pathologie en fonction de l'oscillation australe du phénomène El niño. Dans l'étude de l'écologie de *V. cholerae*, l'existence d'un état de dormance chez cette espèce (également décrit chez *V. vulnificus* et de nombreuses autres genres et espèces bactériennes) qualifié d'état viable non cultivable a considérablement freiné les études (Colwell et Huq, 1999 ; Linder et Oliver, 1989). L'apport des techniques moléculaires à ces études a donc été immense, puisque certaines ne nécessitent aucune culture préalables (Brauns *et al.*, 1991).

De même, des variations saisonnières ont été mises en évidence par Enger *et al.* (1991) dans les comptages de *V. salmonicida* aux alentours des fermes de saumons en Norvège. Bien que ce germe psychrophile pathogène de poissons soit présent toute l'année, les comptages hivernaux sont plus élevés.

Ainsi, des études **d'écologie microbienne** pourraient permettre de préciser si *V. penaeicida* est **associé à des particules** biotiques (Copépodes ou débris de chitine, phytoplanctontes...) ou abiotiques (matières minérales en suspension), ou si il est importé dans les élevages sous une **forme libre**, de préciser le **caractère saisonnier** de son incidence sur les élevages de crevettes. Une meilleure appréhension de l'écologie microbienne des **bassins d'élevage** et de **leur environnement**, tant au niveau de la **flore bactérienne** que du **phytoplancton** pourrait permettre d'envisager de **nouvelles stratégies de prévention ou de lutte**. Au cours de ces travaux, il importera d'envisager la possibilité d'un **état viable mais non cultivable** chez cette espèce.

Au cours d'études sur la pathologie des crevettes d'élevage en Nouvelle Calédonie, une hypothèse a pu être émise sur le mécanisme pathogénique de la contamination des crevettes par *V. penaeicida*. Ainsi, les exoenzymes chitinolytiques dont sont pourvues les souches de cette espèce pourraient être à l'origine d'une forme nouvelle de maladie bactérienne de la cuticule (Cook et Lofton, 1973) observée en Nouvelle-Calédonie. La première observation de ces lésions, bien que n'étant pas associée à une mortalité anormale, a suscité un émoi important. En effet, l'apparence externe des lésions est similaire à celles qui sont associées au baculovirus responsable de la "maladie des points blancs", le WSSV (Lightner, 1996). Des critères de diagnostic différentiel entre ces deux types de lésions ont pu être établis. L'étiologie la plus probable des lésions observées sur les crevettes juvéniles et géniteurs en Nouvelle-Calédonie est l'attaque de la cuticule par des bactéries chitinolytiques au niveau de lésions primaires microscopiques de l'épicuticule. Ces lésions pourraient de plus constituer une voie d'entrée pour des bactéries pathogènes.

L'étude précise des voies d'entrée des *Vibrio* pathogènes ainsi que d'autres aspects de la pathogénie de l'infection pourraient être étudiées avec plus de précision à l'aide de techniques **d'immunohistochimie** comme Sung et Song (1996) l'ont réalisé sur *P. monodon*, voire de **PCR *in situ***. Dans le cadre d'études sur la pathogénie de la vibriose à *V. penaeicida*, l'étude du mécanisme de **portage asymptomatique** devrait en particulier présenter un intérêt certain. Les mécanismes de **survie de la bactérie dans l'hôte** pourraient notamment mettre en œuvre la présence d'une **capsule** comme cela a été montré pour *V. vulnificus* (Biosca *et al.*, 1993).

Cette hypothèse paraît plausible du fait de la dissociation sur gélose de colonies opaques et translucides comme cela est noté pour *V. vulnificus*. La réversion de l'état opaque à l'état translucide (Goarant, données non publiées), ainsi que des ribotypes parfaitement identiques (Costa *et al.*, 1998 b) pourraient correspondre à l'expression ou l'absence d'expression de ce caractère de la même façon que chez *V. vulnificus* (Biosca *et al.*, 1993 ; Amaro *et al.*, 1994).

L'étude de la **pathogénie** des vibrioses est par ailleurs nécessairement intimement liée à l'étude de **l'écologie** de l'agent pathogène (Baudin-Laurencin, 1987).

En effet, les conditions écologiques jouent toujours un rôle majeur dans le déclenchement de ces maladies. Cela a également été montré dans le cadre du Syndrome 93 par les résultats de notre suivi épidémiologique de *V. penaeicida*.

Des facteurs toxiques ont été mis en évidence dans le surnageant de culture de *V. penaeicida* AM 101. Ces facteurs correspondent probablement à une ou des exotoxines. En effet, les exotoxines constituent un facteur majeur de la pathogénie de nombreuses maladies bactériennes (Finlay et Falkow, 1997). Chez les bactéries du genre *Vibrio*, des exotoxines ont pu être mises en évidence chez des souches de *V. harveyi* (Saeed, 1995), *V. anguillarum* (Umbreit et Tripp, 1975 ; Toranzo *et al.*, 1983 ; De la Cruz et Muroga, 1989), *V. vulnificus* (Kreger et Lockwood, 1981), *V. damsela* (Kreger, 1984 ; Kothary et Kreger, 1985), et bien sûr chez *V. cholerae* (Nishibuchi et Seidler, 1983).

Dans notre étude, il a été mis en évidence que ce ou ces facteurs toxiques sont exprimés en fonction de la **température** chez *V. penaeicida* souche AM 101. De façon intéressante, une température plus basse que la température optimale de culture de *V. penaeicida* AM 101 est responsable de cette expression. Il serait intéressant **d'isoler et de caractériser** ce ou ces facteurs toxiques. La première étape consistera à réaliser des **migrations en SDS-PAGE** afin de **comparer les profils** des surnageants de cultures réalisés à différentes températures. La mise en évidence de **bandes différentielles** permettrait de confirmer des **expressions différentielles** de protéines excrétées en fonction de ce paramètre physique. Dans ce cas, une **purification** des facteurs différenciellement exprimés devrait permettre de déterminer lequel est responsable de la létalité. Une fois ce facteur caractérisé, il serait possible de s'appuyer sur les banques de séquences génomiques, bénéficiant ainsi des connaissances acquises chez les *Vibrio* spp. à pouvoir pathogène pour d'autres espèces aquatiques, voire pour l'homme.

En effet, des séquences de gènes codant pour des facteurs de virulence de *Vibrio* spp. ont été publiées et pourraient servir à rechercher des séquences identiques ou proches dans le génome des bactéries que nous étudions. Toutefois, une grande prudence s'impose alors lors de l'interprétation des résultats, et il convient plus que jamais de confirmer ou infirmer que le facteur mis en évidence est bien lié à la virulence chez l'hôte étudié. Ainsi, Osorio *et al.* (2000) ont récemment remis en question le rôle réel de la phospholipase-D de *Vibrio damsela* (damselysin) considéré jusqu'alors comme un facteur de virulence majeur de cette espèce anthroponotique aussi bien chez les Mammifères que chez les Poissons.

Chez *V. anguillarum*, plusieurs gènes associés à la virulence ont un support plasmidique (Crosa *et al.*, 1977 et 1980). La similarité de pouvoir pathogène des isolats calédoniens des deux espèces *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo* nous incitent à envisager une origine, au moins

partiellement, plasmidique aux facteurs de virulence. Un travail sera initié portant sur l'étude du support génétique de la virulence. Des travaux préliminaires ont déjà permis de mettre en évidence la présence d'un plasmide de grande taille dans les souches de *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo*, ainsi que de réaliser les premières analyses des profils de restriction sur le plasmide de *V. penaeicida* souche AM 101.

Cette étude devrait logiquement se poursuivre par la **comparaison des plasmides d'une sélection de souches** isolées au cours d'épisodes de mortalité dus au Syndrome 93. **L'électrophorèse en champ pulsé trouverait ici une place de choix**, permettant d'obtenir rapidement des informations complètes sur l'organisation génomique des souches étudiées, y compris la mise en évidence de plasmides de grande taille généralement mal extraits par les techniques d'extraction d'ADN plasmidique classiques. Des **infections expérimentales**, couplées à une **analyse histologique** des animaux infectés, tenteront ensuite d'établir une **corrélation** entre la présence d'un ou plusieurs plasmides et le pouvoir pathogène expérimental.

Si une corrélation de ce type est établie pour nos isolats de *V. penaeicida* ou *V. nigripulchritudo*, deux approches peuvent être envisagées pour confirmer le rôle du plasmide dans la virulence.

La première approche consiste à débarrasser une souche virulente de son ou ses plasmides, pratique qualifiée de "**curage**".

Cette approche a été utilisée par Crosa *et al.* (1980) pour démontrer la corrélation entre la présence du plasmide pJM1 et la virulence chez *V. anguillarum*. Bien que les conditions de culture (notamment une température élevée) puissent favoriser le curage spontané chez *Escherichia coli* (Smith et Bidochka, 1998), ce facteur pourrait n'avoir qu'un effet limité sur les plasmides des *Vibrio*. Toutefois, d'autres systèmes ont été proposés pour curer des plasmides chez des souches de *Vibrio* (Valla *et al.*, 1992). Le curage spontané a en effet été étudié en fonction de la température de conservation des souches (entre -80°C et +37°C pendant 18 mois) et de repiquages (quotidiens pendant 100 jours) chez *V. anguillarum* par Pedersen (1997). Il a montré une remarquable stabilité des profils plasmidiques des souches de son étude.

La seconde consiste à l'opposé à introduire le plasmide dans une souche non virulente et à étudier la virulence de la souche ainsi transformée. La **transformation** peut notamment être réalisée par électroporation comme cela a été réalisé par Cutrin *et al.* (1995) qui en ont optimisé les conditions pour *V. anguillarum*.

L'étude de l'acquisition de la sensibilité de *Litopenaeus stylirostris* à l'infection par *V. penaeicida* a permis de montrer que les animaux deviennent sensibles à partir d'un développement correspondant à un stade de juvénile.

Ce résultat ouvre la porte à des études plus précises de la virulence de *V. penaeicida* à l'égard de *L. stylirostris*. Il permet en effet de disposer d'un modèle d'individu que l'on peut considérer comme **réfractaire à l'infection**. Ces individus ont un **génotype identique** aux juvéniles ou aux adultes ; l'expression de ce génotype correspond à ce stade à un **phénotype non sensible** à l'infection. L'étude des **gènes différentiellement exprimés** (comparaison des profils d'ARNm) entre les postlarves et les juvéniles pourrait permettre de mettre en évidence des **gènes associés à la sensibilité** à l'infection par *V. penaeicida*. Des applications à la **sélection de lignées de crevettes plus résistantes** à l'infection pourraient être envisagées.

Parallèlement, il convient de souligner ici l'intérêt que présenterait pour les études de virulence ou de pathogénie une souche de *V. penaeicida* non pathogène.

La vaccination et l'utilisation d'immunostimulants sont des approches alternatives aux abus d'antibiotiques qu'ont parfois connu les élevages aquacoles (Brown, 1989). La vaccination a connu des développements importants dans les élevages piscicoles (Colwell et Grimes, 1984 ; Baudin-Laurencin, 1987 ; Austin et Austin, 1993), de même que l'usage d'immunostimulants (Skerjmo *et al.*, 1995 ; Itami *et al.*, 1996 a). Chez les Crustacés, le système immunitaire n'est pas spécifique, et il ne possède pas de mémoire. Le terme de vaccination a pourtant été consacré par l'usage pour l'immunostimulation à l'aide de bactéries tuées. Certains auteurs rapportent des effets bénéfiques de ces pratiques (Itami *et al.*, 1989, 1991, 1992 a, 1992 b et 1996 b ; Teunissen *et al.*, 1998). La voie orale (qui permet l'usage d'aliment médicamenteux) est parfois préconisée par les fabricants pour sa facilité d'administration. Toutefois, les auteurs qui ont testé cette voie d'administration démontrent que celle-ci n'apporte pas de protection efficace (Itami *et al.*, 1992b ; Alabi *et al.*, 1999).

La sélection génétique a permis chez les Poissons et nombre d'autres espèces domestiques d'améliorer l'expression de qualités recherchées dans les espèces élevées. L'aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie dispose d'une des plus anciennes souches domestiquées de crevettes. La maîtrise du cycle complet de *Litopenaeus stylirostris*, qui a permis son élevage

dans une région d'où elle est initialement absente permet d'envisager la mise en place de programmes de sélection génétique, comme le souligne Browdy (1998). La résistance à des maladies bactériennes a été significativement améliorée chez différentes espèces de poissons (Sovenyi *et al.*, 1988 ; Gjerdrem *et al.*, 1991 ; Kirpichnikov *et al.*, 1993).

La sélection massale, testée d'une façon simple à la Station d'Aquaculture de Saint Vincent, pourrait permettre d'obtenir une amélioration des survies dans les élevages affectés par le Syndrome 93. Des essais plus rigoureux seront entrepris par la mise en œuvre dans les mois prochains d'un programme " génétique crevettes " à la SASV. Un **plan de sélection** sera mis en place, qui devra permettre, outre de confirmer ces résultats préliminaires, d'évaluer **l'héritabilité** de ce caractère tout en maintenant dans la population exploitée une **variabilité génétique maximale**. Dans l'état actuel des connaissances, cette approche semble parmi les plus prometteuses.

Présentations à congrès et publications

Présentation à congrès n° 1 :

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. Poster de présentation générale du Syndrome 93 au congrès annuel de la World Aquaculture Society, 29 janvier au 2 février 1996, Bangkok. Book of abstracts, pp. 139-140.

STUDY OF EPISODES OF MORTALITY OBSERVED IN REARED *Penaeus stylirostris* SINCE 1993 IN NEW CALEDONIA: I - BIOTECHNICAL IMPACT AND GROSS SIGNS IN DISEASED PRAWNS

Cyrille Goarant^{1*}, Isabelle Mermoud², Robert Costa³, Philippe Haffner⁴, and Eric Boglio¹

- (1) Laboratoire Recherche Aquacole - IFREMER en Nouvelle-Calédonie
Station d'Aquaculture de St Vincent
Quai des Scientifiques, B.P. 2059
98846 Nouméa cédex, NEW CALEDONIA
- (2) CfrAD/EMVT, BP 1 86
98845 Nouméa cédex, NEW CALEDONIA
- (3) Laboratoire Territorial de Recherche et Diagnostic Vétérinaire
BP 42, 98890
Païta, NEW CALEDONIA
- (4) Laboratoire Biologie et Ecologie des Invertébrés Marins - IFREMER
Station de la Tremblade, Ronce-les-Bains, BP 133
17390 La Tremblade, FRANCE

Penaeus stylirostris, a non-indigenous species imported from Tucson in 1981 and reared in closed cycle since, is the main cultured penaeid prawn species in New Caledonia. Growout is semi-intensive and stocking densities range from 20/m² (without aeration) to 40/m² (with aeration). Total growout pond surface in New Caledonia was 360 ha in 1995.

140

Since 1993, a pathology is observed in some ponds during growout. Episodes of mortality are observed from a mean prawn weight of 2 grams and are more often observed in winter. Mortality can be epizootic, killing 10 to 20% of a crop within a few days, or chronic. From a few to over 1,000 moribund or dead prawns are observed from the pond edges. Dead prawns are also observed when diving (up to 3 or 4 prawns/m²), in feed trays or in cast nets during sampling.

Mean crop survival in affected ponds is 30% compared with 55% normally, which jeopardises the economic viability of this aquaculture. Epizootics are generally triggered by various stresses such as a sudden temperature drop, handling and transferring prawns, a moulting peak,...(Abnormal pond conditions lower mean temperatures and higher salinities in winter) have been noted since 1993), associated with an "El Nino" phenomenon.

Affected prawns are weak and show an abnormal swimming behaviour, being close to the surface and the edges of ponds. An increased number of birds is often observed near affected ponds. Moribund prawns are dull; shell coloration is often darker than usual; the muscle is whitish legs are sometimes orange to red; the gut is often empty- hemolymph clotting time is increased. Research on this *a priori* plurifactorial disease is focused on an epidemiological, a bacteriological, a histological and a viral study. Preliminary results of those studies are presented in three following posters.

KEYWORDS: Penaeid shrimp culture; Shrimp diseases; *Penaeus stylirostris*

Présentation à congrès n° 2 :

Goarant, C. ; Boglio, E. ; Lemonnier, H. ; Della Patrona, L. : 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. Poster présenté à Island aquaculture and tropical aquaculture; 4 au 9 Mai 1997 ; Les trois îlets, Martinique. Book of abstracts p. 143.

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.

C. Goarant, E. Boglio, H. Lemonnier, L. Della Patrona

Laboratoire de Recherche Aquacole IFREMER en Nouvelle-Calédonie, Station d'Aquaculture de Saint-Vincent, BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, New Caledonia.

Introduction

Shrimp aquaculture (*Penaeus stylirostris*) in New Caledonia has been affected since 1993 by a disease named Syndrome 93. Mortality appears during growout, mostly at times of rapid temperature changes. Bacteria from the genus *Vibrio* (mostly *V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo*) seem to have a major role in the disease pathogeny.

Pathologies in aquaculture are often complex; environment quality, which is influenced by zootechnical practices, can often be a trigger or aggravating factor in the development of diseases. The selection of disease resistant animals is a major research area in the fight against pathologies. Controlling the environment and genetic selection aim to limit the use of medication (especially antibiotics when dealing with bacterial aetiologies) which is a barrier to the commercialisation and a clean image of the product.

The present study aimed at measuring shrimp survival and water bacterial flora with water exchange rates in ponds, and to carry out a preliminary trial using animals selected for their genetic resistance to Syndrome 93.

Materials and Methods

In early winter of 1996 (March), six ponds of about 1500m² each at the Station d'Aquaculture de Saint-Vincent (ponds 2 to 7) were seeded at a density of approximately 20 postlarvae.m². Two (6 and 7) were seeded with postlarvae produced from shrimp which had survived a Syndrome 93 mortality episode (RS93), whereas ponds 2 to 5 (normal) were seeded with PIs issued from broodstock reared in normal conditions, only lightly affected by the disease.

All postlarvae had similar and simultaneous larval rearing and acclimation conditions. The comparative rearing using those two shrimp lines was conducted in semi-intensive conditions as is usual in New Caledonia, without fertiliser or aeration, using mean water exchange rates of 10.5, 10.5, 17, 22, 17 and 22% per day for ponds 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively. Shrimp were harvested simultaneously after 209 days rearing.

Parameters recorded during rearing were : morning D.O. and temperature daily, Secchi depth (turbidity) and salinity twice a week and after heavy rain, and mortalities twice daily (dead and moribund shrimp on pond edges). Water bacterial flora was measured weekly by plate counting using Petri dishes in ponds 2 to 5 and in the intake water. The presumptive *Vibrio* flora (using TCBS agar) and part of the total heterotrophic flora (using Marine Agar 2216E) were measured after 24 h incubation at 30°C.

Neither *V. penaeicida* nor *V. nigripulchritudo* usually grow on TCBS agar within 24 hours, but grow on Marine Agar within that time. Results from ponds 2 to 5 were analysed using a correlation matrix (Stat Graf software). Weekly mortality is the cumulative mortality over 7 days as from day 1 of the week.

Results and Discussion

All 6 ponds were affected by Syndrome 93, especially from day 80 to day 98. Interesting correlations are for ponds 2 to 5 : A positive correlation between weekly mortalities and the logarithm of the measured heterotrophic flora ($p = 0.0027$, $n = 92$) ; A negative correlation between weekly mortality and morning temperature ($p = 0.0057$, $n = 96$) and an increase in the *Vibrio* flora with time.

A more dynamic view shows that an increase in the heterotrophic flora in the intake water on day 77 was followed by an increase in the heterotrophic flora in ponds 2 to 5, and by a mortality peak in those ponds. The observed increase in the intake water occurred during a mortality episode in a large nearby pond (30 000m²) which effluents (about 10 000m³ per day) are partially recirculated due to the location of the intake structure, especially on a falling tide.

Final and mean results (see table 1) show that ponds with the lowest water exchange rate have the lowest survival rates, a higher mean heterotrophic flora and a much higher mean *Vibrio* flora. It would therefore appear beneficial to increase water exchange rate during times of high Syndrome 93 incidence. Variations in the bacterial flora could therefore be indicators which would allow to evaluate the risks of a pond developing the disease.

Ponds seeded with «RS 93» shrimp had higher survival than those seeded with normal shrimp, by about 7% in each case. This suggests that it would be possible to increase shrimp resistance to Syndrome 93 using genetic selection.

Table 1 : mean and final results (survival, FCR, mean weight and mean bacterial levels) of the six ponds included in the study. (n.d. : not determined)

	intake	Pond 2	Pond 3	Pond 4	Pond 5	Pond 6	Pond 7
Shrimp strain		Normal	Normal	Normal	Normal	RS 93	RS 93
Mean water exchange / day		10.5%	10.5%	17%	22%	17%	22%
survival (%)		23.8	29.3	26.5	36.2	34.8	41.8
final weight (g)		27.8	26.4	26.8	25.6	25.9	23.4
F.C.R.		3	2.7	3	2.6	2.4	2.5
Mean TCBS counts (CFU/ml)	120	555	805	380	235	n.d.	n.d.
Mean Marine Agar counts (CFU/ml)	2310	4060	3895	4070	3695	n.d.	n.d.

Conclusions

The higher survival rates obtained using animals which parents survived strong Syndrome 93 mortality episodes indicate that it would be possible to select for shrimp which have a higher resistance to the disease. A mass selection program should therefore produce conclusive results. The bacteriological study showed the effects of water exchange rate on the bacterial flora, and a link between that flora and the incidence of the disease in ponds. The mortalities observed in the ponds monitored appeared following an increase in the bacterial flora in the intake water, which in turn occurred following a mortality episode in a nearby pond. This is indicative of a disease which can be carried by the water. The analysis of other parameters (in progress) and future works will aim to determine whether the increase in the bacterial flora is due to an increase in the number of pathogens which are responsible for the mortalities, or if it merely reflects a degradation of the rearing environment.

Publication n° 1 :

Goarant, C. ; Merien, F. ; Berthe, F. Mermoud, I. ; Perolat, P. (1999) : Arbitrarily Primed PCR to type *Vibrio* spp pathogenic for shrimp. Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1145-1151.

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 Saint 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, Ronces 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 penaeicida* 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. penaeicida* 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. penaeicida*. Since 1994, *V. penaeicida* 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. penaeicida* KH-1^T (which was isolated from *Penaeus japonicus* in Japan), *V. alginolyticus* CIP 103336^T (= ATCC 17749), *V. harveyi* CIP 103192^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. penaeicida* isolates from New Caledonia with others field strains, three Japanese *V. penaeicida* 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.

TABLE 1. *Vibrio* sp. reference strains and field isolates used in the present study

Organism or source and isolate name, isolation date, ^a and origin	Identification
Reference strains	
<i>V. alginolyticus</i> CIP 103336 ^{Tb}	
<i>V. harveyi</i> CIP 103192 ^T	
<i>V. nigrapulchrinado</i> CIP 103195 ^T	
<i>V. penaeicida</i> KH-1 ^T	
Japanese field strains	
<i>V. penaeicida</i> KO-1, 1986, Japan	
<i>V. penaeicida</i> KT-1, 1986, Japan	
<i>V. penaeicida</i> PD-A, 1986, Japan	
New Caledonian field strains	
Aquamon farm	
AQ61, ^c March 1994, NC ^d	<i>V. alginolyticus</i> ^e
AQ66, ^f March 1994, NC	<i>V. alginolyticus</i> ^e
AQ102, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ103, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ104, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ105, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ106, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ107, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ109, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ110, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ111, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ112, June 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AQ113, June 1995, NC	<i>V. harveyi</i>
AQ114, June 1995, NC	Not identified
Aquamor farm	
AM23, October 1994, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM101, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM102, May 1995, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i>
AM107, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM108, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM109, May 1995, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i>
AM111, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM112, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM113, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
AM114, May 1995, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i>
AM115, May 1995, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i>
AM116, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
FAO farm	
F1, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F2, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F5, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F6, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F11, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F14, ^f May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F15, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F24, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
F25, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
Sea Farm	
SE5, January 1994, NC	<i>V. alginolyticus</i>
SF100, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF101, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF113, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF116, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF121, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF122, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF125, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF126, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>
SF127, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i>

Continued

TABLE 1—Continued

Organism or source and isolate name, isolation date, ^a and origin	Identification
SF140, May 1995, NC	<i>V. penaeicida</i> ^e
SF143, March 1995, NC	<i>V. penaeicida</i> ^e
Sodalac farm	
SO27, ^b October 1994, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i> ^e
SO38, May 1995, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i> ^e
SO65, May 1995, NC	<i>V. nigrapulchrinado</i> ^e
Webuihoone farm	
W1, ^b April 1994, NC	Not identified
W2, April 1994, NC	Not identified
W11, April 1994, NC	<i>V. harveyi</i> ^e

^a The isolation date corresponds to the date of isolation from the field for field strains.

^b T indicates type strain.

^c Underlined strains were isolated on marine agar from diseased cultured *P. stylosis* hemolymph containing more than 100 CFU of the monomorphic bacterial strain per drop of hemolymph.

^d NC, strain isolated on marine agar 2216E (Difco Laboratories) from cultured *P. stylosis* hemolymph in New Caledonia.

^e Strain previously identified by DNA-DNA hybridization and ribotyping (6).

^f Isolated in marine broth from diseased cultured *P. stylosis* hemolymph.

^g Isolated on TCBS agar from diseased cultured *P. stylosis* hemolymph.

^h Major strain isolated on marine agar from apparently healthy cultured *P. stylosis* hemolymph.

was done by using phenotyping tests (Biotype 100, Api System; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). In addition, selected strains (Table 1) were subjected to DNA-DNA hybridization and ribotyping in a parallel taxonomic study (6).

Geographical and zootechnical data. The shrimp farms included in the study are located on the southwest coast of New Caledonia (Fig. 1). Aquamon (AQ isolates), FAO (F isolates), and Sea Farm (SF isolates) are located on Saint Vincent Bay. Sodalac (SO isolates) and Aquamer (AM isolates) are located on Moindou Bay, 50 km north of Saint Vincent Bay. Webuihoone (W isolates) is located 150 km north of Moindou Bay. Aquamer is located at the Moindou estuary; there is evidence that it recycles some of the outlet water from Sodalac, as well as its own. Postlarvae stocked in the ponds originate from two separate hatcheries. Aquamer and Sodalac usually stock postlarvae from the Mara hatchery, located close to Sodalac on Moindou Bay, whereas Aquamon, FAO, and Sea Farm usually stock postlarvae from the Montagnes hatchery, located near Aquamon on Saint Vincent Bay, but there are many transfers of postlarvae between

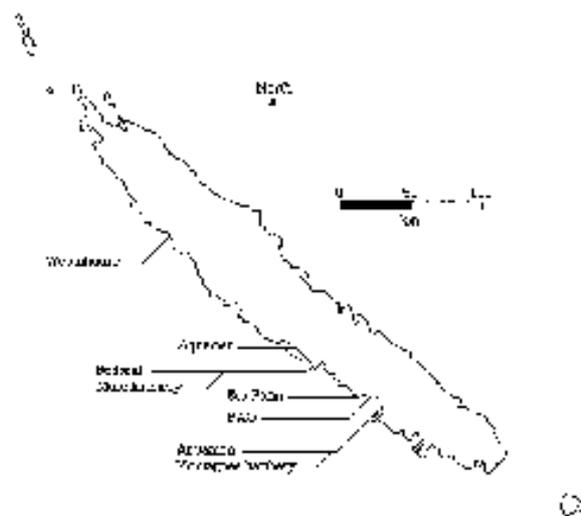


FIG. 1. Schematic map of New Caledonia showing the locations of the shrimp farms and hatcheries discussed in this report.

these two bays. A preliminary field survey did not find either *V. penaeicida* or *V. nigripulchritudo* strains in any postlarval stock.

Extraction of bacterial genomic DNAs. *Vibrio* strains were cultured in tryptic soy broth (BioMérieux) supplemented with 2% NaCl (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) at 30°C with continuous shaking until the stationary phase of growth was reached. DNAs were extracted and purified by two different methods. (i) Cultures (50 ml) were harvested by centrifugation at 10,000 × g for 10 min. The resultant pellets were lysed with a 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)-1-mg/ml proteinase K solution, and the bacterial nucleic acids were extracted by a phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, vol/vol/vol) mixture as described by Brenner et al. (4). Extracted DNAs were resuspended in 1× Tris-EDTA buffer. (ii) DNAs were also extracted by using silica particles and guanidinium isothiocyanate lysis buffer in accordance with the 2-h method described by Boom et al. (3) from small culture aliquots (3 to 5 ml).

AP-PCR. Fingerprinting was performed as described previously (30), with minor modifications. Primers KF (5'-CACACGCACACGGAAGAA-3'), KN (5'-CCTTGGCGCATGTACATGG-3'), RSP (5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'), KZ (5'-CCCATGGTACGCGTGTGGG-3'), KpR (5'-CCAAAGTCGACATGGCACRTGTATACATAYGTAAC-3'), KG (5'-CACACGCACACGGAAGAA-3'), and SP (5'-TGTAAAACGACGGCCAG-3') were purchased from Genset (Paris, France). Fifty-microliter reaction mixtures were prepared with 100 ng of DNA-1× Taq polymerase buffer (100 mM Tris [pH 8.3, 20°C], 500 mM KCl)-MgCl₂-0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (Boehringer, Mannheim, Germany)-1 μM single oligonucleotide primer-5 μCi of [³²P]dCTP (3,000 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, England)-1.25 U of Taq polymerase (Amersham).

Amplification reactions were cycled twice in a 96-well GeneAmp 9600 thermocycler (Perkin-Elmer) through a low-stringency temperature profile and then 40 times through a high-stringency temperature profile as previously described (24). Five microliters of each reaction mixture was combined with 15 μl of 98% formamide dye and heated to 68°C for 15 min; 5 μl of each sample was loaded onto a 4% acrylamide-50% urea sequencing gel with 1× TBE (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA), and electrophoresis was performed at 400 V overnight until the xylene cyanol tracking dye was approximately 10 cm from the bottom. pUCBM21 DNA digested by *Hpa*II plus pUCBM21 DNA digested by *Dna*I and *Hind*III (Boehringer), pBR328 DNA digested by *Bgl*II and *Hind*III (Boehringer), and pBR322 DNA digested by *Msp*I (New England Biolabs) were used as molecular size markers. The gel was autoradiographed for 24 to 72 h on Kodak X-Omat X-ray film. Amplicon molecular size was determined by interpolation of the distances of migration (12) of molecular size markers and AP-PCR products. In accordance with Welsh and McClelland (30), only major bands were considered in the analysis as share-derived characters, and this allowed the construction of a key for type grouping of the strains according to the amplicons produced with a given primer (see Table 2).

In order to select primers producing more polymorphism, a first screening of AP-PCR products without [³²P]dCTP was performed by using electrophoresis on a 2% agarose gel (NuSieve 3:1, FMC, Rockland, Maine) with 0.5× TBE buffer (3 V/cm for 16 h), followed by ethidium bromide staining.

RESULTS

Primer selection. On the basis of the fingerprints observed on agarose gel, three (RSP, KF, and SP) of the seven primers tested were selected for accurate study with acrylamide-urea sequencing gel.

DNA extraction techniques and reliability. The fingerprints obtained by AP-PCR using the two different techniques of DNA extraction were identical. The only differences, sporadically observed, were due to insufficient quantities of genomic DNA in the amplification mixture, i.e., 50 instead of 100 ng. These variations affected only a few bands in the fingerprints (data not shown). Therefore, concentrations of genomic DNA extracts were carefully monitored by spectrophotometric determination at 260 nm.

Species identification. On the basis of the AP-PCR fingerprints, 54 of the 57 field isolates were identified as belonging to one of the four species for which a reference strain was included in the studied set (Table 1). Examples are shown in Fig. 2 to 4. The remaining three New Caledonian strains (AQ114, W9, and W1) produced fingerprints unrelated to the AP-PCR patterns of the four type strains included in this study, were characterized by the complete absence of any species-specific amplicon, and, consequently, were not identified. For these three strains, phenotypic tests previously performed were inconclusive. Some highly conserved amplicons were found to be

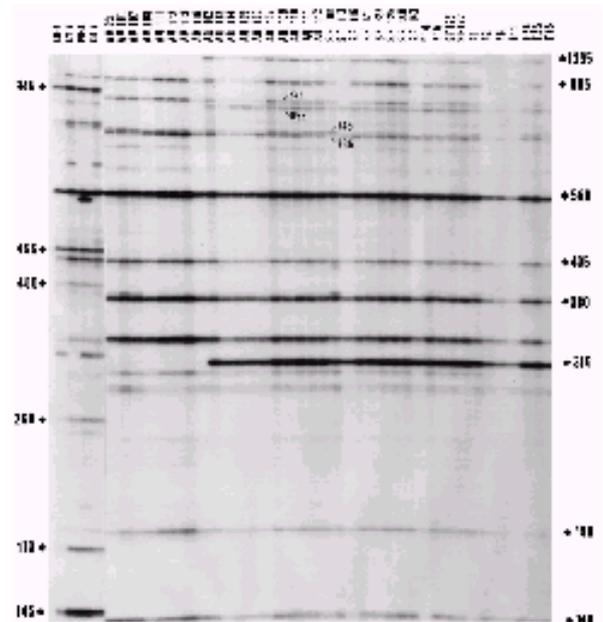


FIG. 2. AP-PCR fingerprints of selected *V. penaeicida* strains produced with primer SP. Shown is an autoradiogram of a denaturing 5% acrylamide gel with TBE. The data for isolates in the upper part are given in Table 1. Molecular sizes (in base pairs) determined as described in Materials and Methods are given on the sides.

genospecies specific. (i) With primer SP, *V. penaeicida* was characterized by 335-, 435-, 560-, and 985-bp fragments, *V. nigripulchritudo* was characterized by 225-, 440-, 565-, 940-, and 1,240-bp fragments, *V. harveyi* was characterized by 165-, 310-, 365-, 510-, 745-, and 970-bp fragments, and *V. alginolyticus* was characterized by 230-, 595-, and 745-bp fragments (Fig. 2). (ii) With primer RSP, *V. penaeicida* was characterized by 160-, 210-, 215-, 405-, 770-, and 860-bp fragments, *V. nigripulchritudo* was characterized by 355-, 650-, 675-, and 940-bp fragments, *V. harveyi* was characterized by 150-, 195-, 205-, 270-, 295-, 355-, 365-, 450-, and 540-bp fragments, and *V. alginolyticus* was characterized by 225-, 275-, 450-, 480-, and 745-bp fragments (Fig. 3). (iii) With primer KF, *V. penaeicida* was characterized by 170-, 220-, 360-, and 725-bp fragments, *V. nigripulchritudo* was characterized by 215-, 250-, 400-, and 825-bp fragments, *V. harveyi* was characterized by 300-, 475-, and 1,065-bp fragments, and *V. alginolyticus* was characterized by 545-, 645-, and 735-bp fragments (Fig. 4).

The New Caledonian *Vibrio* isolates were distributed among the four genospecies as following: isolates AQ61, AQ66, and SF5 were identified as *V. alginolyticus*, isolates AQ113 and W11 were identified as *V. harveyi*, and isolates AM102, AM109, AM114, AM115, SO27, SO38, and SO65 were identified as *V. nigripulchritudo*. The remaining 38 isolates were identified as *V. penaeicida* (as detailed in Table 1). The three Japanese isolates were confirmed to belong to *V. penaeicida*.

Intraspecific differences among *V. penaeicida* strains. Comparative results are summarized in Table 2. Japanese *V. penaeicida* isolates could be discriminated from ones from New Caledonia by using each of the three primers. With primer SP, Japanese *V. penaeicida* strains were characterized by 145-, 170-, 260-, 400-, 455-, 870-, and 945-bp fragments and New

TABLE 2. Distribution of *V. penaeicida* field isolates according to the presence or absence of specific AP-PCR products obtained with primers SP, RSP, and KF^a

Isolate (origin) ^b	Presence of fragment or fragment cluster:				
	A ^c	B ^d	C ^e	D ^f	E ^g
KO-1 (J)	+	-	-	-	-
PD-A (J)	+	-	-	-	-
KT-1 (J)	+	-	-	-	-
AM23 (NC)	-	+	-	-	-
AM101 (NC)	-	+	-	-	-
AM107 (NC)	-	+	-	-	-
AM108 (NC)	-	+	-	-	-
AM111 (NC)	-	+	-	-	-
AM112 (NC)	-	+	-	-	-
AM113 (NC)	-	+	-	-	-
AM116 (NC)	-	+	-	-	-
AQ102 (NC)	-	+	+	+	-
AQ103 (NC)	-	+	+	+	-
AQ104 (NC)	-	+	+	+	-
AQ105 (NC)	-	+	+	+	-
AQ106 (NC)	-	+	+	+	-
AQ107 (NC)	-	+	+	+	-
AQ109 (NC)	-	+	+	+	-
AQ110 (NC)	-	+	+	+	-
AQ111 (NC)	-	+	+	+	-
AQ112 (NC)	-	+	+	+	-
SF126 (NC)	-	+	+	+	+
SF127 (NC)	-	+	+	+	+
SF100 (NC)	-	+	+	+	-
SF113 (NC)	-	+	+	+	-
SF116 (NC)	-	+	+	+	-
SF121 (NC)	-	+	+	+	-
SF122 (NC)	-	+	+	+	-
SF125 (NC)	-	+	+	+	-
SF140 (NC)	-	+	+	+	-
SF143 (NC)	-	+	+	+	-
SF101 (NC)	-	+	+	+	+
F1 (NC)	-	+	+	-	+
F2 (NC)	-	+	+	-	+
F3 (NC)	-	+	+	-	+
F6 (NC)	-	+	+	-	+
F11 (NC)	-	+	+	-	+
F14 (NC)	-	+	+	-	+
F15 (NC)	-	+	+	-	+
F24 (NC)	-	+	+	-	+
F25 (NC)	-	+	+	-	+

^a The data for the isolates in the left column are given in Table 1.

^b J, Japan; NC, New Caledonia.

^c Includes 145-, 170-, 260-, 400-, 455-, and 945-bp fragments obtained with primer SP, 290- and 650-bp fragments obtained with primer RSP, and 210- and 760-bp fragments obtained with primer KF.

^d Includes 140-, 190-, 280-, 285-, 380-, 735-, 745-, and 875-bp fragments obtained with primer SP, 200-, 250-, 315-, 320-, 480-, 560-, 575-, 695-, and 700-bp fragments obtained with primer RSP, and 340-, 400-, 790-, and 1,490-bp fragments obtained with primer KF.

^e Includes 315-, 795-, 855-, and 1,235-bp fragments obtained with primer SP.

^f A 280-bp fragment obtained with primer RSP.

^g A 1,650-bp fragment obtained with primer KF.

identification of species and strains of *Vibrio* (19) and another arbitrary amplification method, random amplification of polymorphic DNA (33), was shown to be efficient for the differentiation of the two biotypes of *V. vulnificus* (2). Arbitrary amplification of DNA, which allows analysis of the whole genome, is considered a powerful approach for the study of DNA poly-

morphism and is usable for the comparison of genomes from eukaryotes (31) or bacteria (25, 32). In this case, AP-PCR can be used for species identification and provides information on intraspecific differences usable for molecular epidemiology studies (25, 32).

Analysis of AP-PCR fingerprints allowed us to categorize a significant set of *Vibrio* field isolates. The epidemiological approach of our study is original in that 35 of 53 field isolates were included on the sole basis of their isolation in high numbers in moribund-shrimp hemolymph during syndrome 93 mortality episodes without any previous analysis of these strains; the 18 others were previously studied by ribotyping (Table 1) (6). AP-PCR allowed identification to the genospecies level when fingerprints of field isolates were compared with those provided by reference strains of genospecies. In addition, complete agreement between AP-PCR and ribotyping data was observed. Fifty of the 53 field isolates were identified as belonging to one of the four genospecies included in the study. The three Japanese isolates exhibited AP-PCR fingerprints which were characteristic of *V. penaeicida*.

All isolates originating from the three mortality peaks that occurred in 1995 were identified as *V. penaeicida* or *V. nigripulchritudo*, except two strains (one *V. harveyi* and one not identifiable). This observation confirms the major epidemiological role of these two genospecies in the pathogenesis of syndrome 93 and demonstrates that several *Vibrio* species and strains were implicated in the pathogenesis of this syndrome, indicating the importance of environmental factors and zootechnical practices. Although *V. penaeicida* was first described (13) in a shrimp vibriosis in Japan, this is the first report on the possible pathological role of *V. nigripulchritudo* in marine aquaculture. The earlier role of *V. alginolyticus* and *V. harveyi* in the pathology could have been surpassed by the more pathogenic strains of *V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo* (11). This hypothesis could explain the change in the infection pattern of *Vibrio* species involved in the outbreaks, with a major role of *V. alginolyticus* and *V. harveyi* in the initial episodes (1993 and 1994) followed in 1995 by the increasing impact of strains of *V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo*.

The present study, conducted with a significant number of *V. penaeicida* isolates, shows the heterogeneity of these strains according to their geographical origins, since AP-PCR fingerprinting allows clustering of isolates. At a first level, the discrimination between isolates originating from Japan and those from New Caledonia was readily possible whatever the primer used. At a second level, on the basis of the presence or absence of some fragments, the SP fingerprints of the *V. penaeicida* strains isolated in New Caledonia were heterogeneous, with two distinct clusters. Similar results were observed with RSP and KF fingerprints. These two clusters were regarded as topotypes located 50 km apart on Saint Vincent Bay and Moindou Bay, as there was a perfect correlation between the geographical area of origin and a particular fingerprint. These two bays are quite different in ecology, so these two topotypes could have been selected during ecological adaptation to these two respective environments. Moindou Bay is relatively closed, with an important mangrove area, and is probably strongly influenced by aquaculture activities, whereas Saint Vincent Bay is a wide and open bay with few mangrove areas. Within the Saint Vincent Bay topotype, further discrimination was possible that could not be attributed to any geographical, chronological, ecological, or zootechnical differences. However, these investigations would be deepened by phenotypic and virulence studies using representative strains from each cluster. Conversely, the *V. nigripulchritudo* fingerprints were homogeneous whatever the primers used, but these data have to be

confirmed by studying a more comprehensive set of field isolates in order to investigate possible heterogeneity. The results of the present study demonstrate the practical value of this PCR-based strategy in studying marine *Vibrio* isolates for molecular epidemiology purposes. This approach may be applied to the analysis of other marine *Vibrio* strains, especially in aquaculture-pathogenic *Vibrio* species.

All isolates identified as *V. nigrapulchritudo* originated from Sodacal and Aquamer, both of which are located on Moindou Bay. Therefore, it seems that pathogenic *V. nigrapulchritudo* strains were absent from Saint Vincent Bay at the time of the survey. Despite numerous postlarval transfers between these two bays, there has been neither any contamination by pathogenic *V. nigrapulchritudo* in Saint Vincent Bay nor any exchange of *V. penaeicida* topotypes between these two bays, confirming the absence of these pathogenic strains in postlarval stocks. At the time of the survey, both species and derived clusters could be considered geographically restricted. Considering the topotypes and the long persistence of *V. penaeicida* strains in seawater (9), it can be assumed that shrimp ponds were contaminated by the intake water pumped from the bays and that vibriosis must thus be considered a waterborne disease.

This should be confirmed by further ecological studies, but zoosanitary measures should already be taken to avoid possible dissemination of the pathogens. Therefore, shrimp farmers were advised against transfer of live shrimp between the different farms and hatcheries on the different bays. If transfer is necessary, the animals should be treated with antibiotics at the time of transfer, and the water used for the transfer should be sterilized by, as an example, chlorination-dechlorination methods.

Our results demonstrate the practical value of AP-PCR for studying marine *Vibrio* isolates for molecular epidemiology purposes. This approach may be applied to the analysis of other marine *Vibrio* species involved in mariculture pathology. The development of species-specific nonradioactive DNA probes derived from the highly conserved amplicons produced by AP-PCR (16) would simplify identification at the species or subspecies level. In addition, our field results emphasize the importance and the similarity of the respective virulence of *V. penaeicida* and *V. nigrapulchritudo* isolates for *P. stylirostris*, concurrently demonstrated by experimental infection studies (11). As virulence plasmids have been reported in *V. anguillarum*, the agent of vibriosis in fish (7, 8, 28), a study aiming to correlate virulence with the plasmid profiles of *V. penaeicida* and *V. nigrapulchritudo* isolates is currently in progress in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Vincent Pomarède for technical assistance, to Eric Boglio for editorial advice, and the Territorial Laboratory of Veterinary Diagnosis of New Caledonia for maintaining and supplying the *Vibrio* field isolate collection.

This work was partly supported by grants from the South and North Provinces of New Caledonia. *V. penaeicida* KH-1^T and the three Japanese field isolates were kindly provided by K. Muroga (Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan). F.M. and P.P. were supported by the International Network of Pasteur Institutes (General Delegation, Institute Pasteur, Paris, France).

REFERENCES

- Austin, B., M. Alsina, D. A. Austin, A. R. Blanch, F. Grimont, P. A. D. Grimont, J. Joffe, S. Koblavi, J. L. Larsen, K. Pedersen, T. Tiainen, L. Verdonck, and J. Swings. 1995. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:285-302.
- Azur, R., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1993. Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:303-309.
- Boon, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.
- Brenner, D. J., A. C. McWhorter, J. K. Leste Knuston, and A. G. Steigerwalt. 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J. Clin. Microbiol.* 15:1133-1140.
- Brock, J. A., and B. LeaMaster. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimps, p. 212-226. In J. Wyban (ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.
- Costa, R., I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haflner, F. Berthe, M. Legroumellec, and P. A. D. Grimont. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with *Penaeus stylirostris* disease (syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164:297-309.
- Cross, J. H., L. L. Hodges, and M. H. Schiewe. 1980. Curing of plasmids is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 27:897-902.
- Cross, J. H., M. H. Schiewe, and S. Falkow. 1977. Evidence for plasmid contribution to virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 18:509-513.
- De La Peña, L. D., K. Momomaya, T. Nakai, and K. Muroga. 1992. Detection of the causative agent of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* 24:223-228.
- Giles, J. S., B. Hariharan, and S. B. Heaney. 1995. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. *Can. J. Microbiol.* 41:209-216.
- Goarant, C., and D. Saulnier. 1997. Unpublished data.
- Grimont, F., and P. A. D. Grimont. 1987. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (Paris)* 137B:165-175.
- Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsushita, and K. Muroga. 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:134-138.
- Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki, and C. Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio baranyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health* 6:27-35.
- Larsen, J. L., and J. E. Olsen. 1991. Occurrence of plasmids in Danish isolates of *Vibrio anguillarum* serovars O1 and O2 and association of plasmids with phenotypic characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2158-2163.
- Letocart, M., G. Baranton, and P. Perolat. 1997. Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35:248-253.
- Lightner, D. V. 1988. *Vibrio* disease of penaeid shrimp, p. 42-47. In C. J. Sidermann and D. V. Lightner (ed.), *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Lightner, D. V. (ed.). 1996. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimps*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.
- Martinez, L., S. Espolid, A. Johansen, J. Welsh, and M. McClelland. 1994. Fast identification of species and strains of *Vibrio* by amplification of polymorphic DNA. *J. Fish Dis.* 17:297-302.
- Mermoud, I., R. Costa, O. Ferré, C. Goarant, and P. Haflner. 1998. "Syndrome 93" in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of three major outbreaks. *Aquaculture* 164:297-309.
- Mohney, L. L., and D. V. Lightner. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquacult. Soc.* 25:116-125.
- Olsen, J. E., and J. L. Larsen. 1993. Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* strains in relation to serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3863-3870.
- Pedersen, K., G. Ceschia, and J. L. Larsen. 1994. Ribotypes of *Vibrio anguillarum* O1 from Italy and Greece. *Curr. Microbiol.* 28:97-99.
- Perolat, P., F. Merien, W. A. Ellis, and G. Baranton. 1994. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 32:1949-1957.
- Ralph, D., M. McClelland, J. Welsh, G. Baranton, and P. Perolat. 1993. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* 175:973-981.
- Sævi, H., A. B. Hval, M. Brum, F. L. Daae, and R. Wiik. 1990. Plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* for epidemiological studies of cold water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1033-1037.
- Takahashi, Y., Y. Shimomaya, and K. Momomaya. 1985. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51:721-730.

28. **Tiinen, T., J. L. Larsen, and S. Pelkonen.** 1994. Characterization of *Vibrio anguillarum* strains isolated from diseased fish in Finland. *Acta Vet. Scand.* **35**:355-362.
29. **Tiinen, T., K. Pedersen, and J. L. Larsen.** 1995. Ribotyping and plasmid profiling of *Vibrio anguillarum* serovar O2 and *Vibrio ordalii*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**:384-392.
30. **Welsh, J., and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**:7213-7218.
31. **Welsh, J., C. Petersen, and M. McClelland.** 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: applications to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* **19**:303-306.
32. **Welsh, J., C. Pretzman, D. Postic, I. Saint Girons, G. Baranton, and M. McClelland.** 1992. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phylogenetic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:370-377.
33. **Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.

Publication n°2 :

Goarant, C. ; Régnier, F. ; Brizard, R. Marteau, A.-L. (1998) : Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169: 291-296.

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

pathology in shrimp, but a primary disease caused by highly virulent strains of *Vibrio* sp. has also been reported (de la Peña et al., 1993). The major genospecies causing vibriosis in shrimp are *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* (Lightner, 1988; Lightner, 1996; Jiravanichpaisal et al., 1994). These pathologies occur at all rearing levels, from hatchery tanks to growout ponds. However, specificity has been reported both at the species and the stage level, so strains responsible for larval and juvenile vibriosis are considered to be different, even when belonging to the same species. Different strains are responsible for larval and juvenile vibriosis in *Penaeus vannamei* in Ecuador (Mohny et al., 1994). Prayitno and Latchford (1995) demonstrated also both species and stages variations in susceptibility of crustaceans to infection by a *V. harveyi*-related organism. Sahul Hameed (1995) demonstrated a species-specificity in the susceptibility of three *Penaeus* species to a *V. campbelli*-like bacterium.

From 1993, shrimp aquaculture in New Caledonia, based on the closed cycle of captive *P. stylirostris* in a semi-intensive farming system, has been affected by a seasonal pathology causing mass mortalities that has been named « Syndrome 93 » (Goarant et al., 1996). New Caledonia has a tropical oceanic climate with a hot season from November to May. Mortality episodes frequently occur during the transition seasons from May to June and from September to October. Moribund shrimp displayed various clinical signs including erratic swimming, lethargy and weakness. High numbers of bacteria belonging to the genus *Vibrio* are systematically isolated from diseased shrimp haemolymph, revealing a bacterial septicemia. Based on phenotypic and genotypic (ribotyping (Koblavi et al., unpublished data) and DNA/DNA hybridization (Berthe et al., unpublished data)) studies, the species involved in the « Syndrome 93 » belong to the genospecies *V. penaeicida*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* and *V. nigripulchritudo*. Since 1994, *V. penaeicida* strains were most frequently isolated, and their very high pathogenicity was demonstrated in an experimental infection design of *P. stylirostris* (Le Groumellec et al., 1996).

The purpose of this study was to determine, using experimental infections with the *V. penaeicida* strain AM 101, the stage at which shrimp become sensitive to this juvenile vibriosis.

2. Material and methods

2.1. Animals

Postlarvae and juvenile *P. stylirostris* used in the experiments originated from the experimental Station d'Aquaculture de Saint Vincent. Challenged postlarvae were aged between 17 and 67 days from the first postlarval stage named « PL1 ». Postlarvae groups for each experimental infection trial were characterized with their mean postlarval stage, determined by the rostral formulae (see Table 1: Le Balle, V., unpublished data) of 30 to 60 animals at day zero of the infection. Because there are nine postlarval stages in *P. stylirostris*, definitive rostral formulae were considered « PL10 » for

Table 1
Rostral formulae and postlarval staging (Le Balle, V. unpublished data)

Rostral formula	Postlarval stage	Value considered for calculating mean PL. stage
1/0	PL 1	1
2/0	PL.2 and PL.3	2.5
3/0	PL.4 and PL.5	4.5
4/0	PL 6	6
4/1	PL 6	6
5/0	PL 7	7
5/1	PL 7	7
5/2	atypical PL 7	7
6/0	atypical PL 8	8
6/1	PL 8	8
6/2	PL 8	8
7/2	PL 9	9
7/3	PL 9	9
7/4	atypical PL 9 or atypical definitive	9.5
8/3	typical definitive rostral formula	10
8/4	atypical definitive	10
9/3	atypical definitive	10
9/4	atypical definitive	10

calculating mean post larval stages, which were then grouped into classes (PL4 to 6; PL7 to 8; PL8 to 8.5; PL8.5 to 9; PL9 to 9.5 and PL > 9.5) for statistical analysis.

2.2. Experimental infections

V. penaeicida strain AM 101 was isolated in 1995 from a « Syndrome 93 » diseased juvenile shrimp (Costa et al., 1996). It was cultured in Marine Broth 2216 E (Difco Laboratories) for 24 h with constant shaking at room temperature. These conditions usually allowed the cultures to reach the late exponential phase. Postlarvae were acclimatized at least 24 h before infections in a temperature-controlled room (26–28°C). They were individually counted, rinsed with sterile filtered sea-water and placed in one-liter experimental beakers filled with sterile filtered seawater (salinity 33–37‰). Each trial was conducted over a 48-h period in the temperature-controlled room and included four treatments: Two treatments representing the « Infected » units:

- Addition of 10 ml of a pure 24-h culture broth per liter (treatment named « Pure »).
- Addition of 10 ml of a 10-fold diluted 24-h culture broth per liter (treatment named « 1/10 »).

Two treatments representing negative controls:

- Addition of 10 ml of sterile Marine Broth per liter (treatment named « ZoBell »).
- No addition (treatment named « Control »).

All treatments were conducted in 15-postlarvae replicates. Airlift hoses were used for aeration. Postlarvae were fed on crushed Nippai® (pelleted complete diet for shrimp) ad libitum 2 to 3 times a day. The surviving postlarvae in each beaker were counted at the

end of the 48-h trial period. The concentration of the culture broth was determined a posteriori by plate counting on Marine Agar (Difco Laboratories) serial dilutions of the pure culture.

2.3. Positive control

Ten acclimatized juvenile *P. stylirostris* (5–15 g) were injected intramuscularly with 50 μ l of the same 24-h culture broth 1000-fold diluted. Postlarval trial results were taken into account only if all positive control juveniles died within a 36-h period.

Lastly, in order to evaluate the survival of juveniles in the same experimental design, 5 replicates of 7 juveniles (2.5 g each) in 3-l beakers were challenged with each of the following treatments: « Pure », « Control » and « ZoBell ». Juveniles reared in earthen ponds aged 67 days since PL1 were acclimatized 24 h in the temperature-controlled room (26–28°C), rinsed with sterile filtered sea-water and placed in experimental beakers filled with sterile filtered seawater (salinity 33–37‰). Data were analyzed using StatView® software.

3. Results

Experimental infections were run at concentrations in the ranges 7×10^5 – 7×10^6 CFU/ml and 7×10^4 – 7×10^5 CFU/ml for « Pure » and « 1/10 » treatments respectively. Mean survival of the trials are shown in Fig. 1.

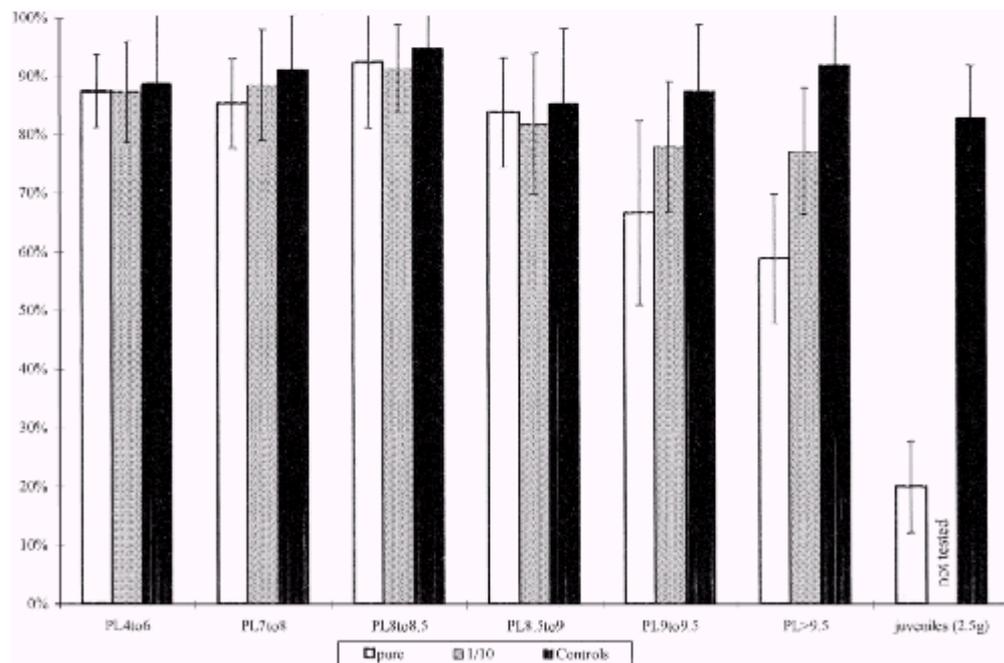


Fig. 1. Mean survival for different postlarval stage classes and treatments. (bars indicate standard deviations)

Table 2
 χ^2 test comparing survival for each postlarval stage class in « Infected » and « Control » treatments

	Mean postlarval stage	Degrees of freedom	χ^2 test (Chi-square test)	Significance level
Infected vs. Control	PL 4 to 6	33	0.24	0.627
Infected vs. Control	PL 7 to 8	32	2.21	0.137
Infected vs. Control	PL 8 to 8.5	38	1.38	0.24
Infected vs. Control	PL 8.5 to 9	22	0.40	0.529
Infected vs. Control	PL 9 to 9.5	87	45.01	< 0.001
Infected vs. Control	PL > 9.5	45	67.93	< 0.001
Infected vs. Control	2.5 g juvenile	13	90.79	< 0.001

Table 3
 Chi-square tests comparing survival in different postlarval stage classes over PL9 in « Pure » and « Control » treatments

Stages compared	Treatment	Degrees of freedom	Chi square	Significance level
PL 9 to 9.5 vs. PL > 9.5	« Pure »	1	14.4	0.001
PL 9 to 9.5 vs. PL > 9.5	« Control »	1	0.04	0.84
Juvenile vs. PL 9 to 9.5	« Pure »	1	29.95	< 0.001
Juvenile vs. PL 9 to 9.5	« Control »	1	1.11	0.29
Juvenile vs. PL > 9.5	« Pure »	1	10.65	< 0.001
Juvenile vs. PL > 9.5	« Control »	1	1.27	0.26

There was no significant difference between the two negative control treatments « Control » and « ZoBell »: χ^2 test run on all data shows that treatments « ZoBell » and « Control » are not significantly different ($\chi^2 = 0.24$, $p = 0.626$). They were therefore considered identical and named « Controls ». A χ^2 test comparing survival was conducted for each mean postlarval stage class on « Controls » and « Infected » data. It demonstrates that survival is significantly affected by *V. penaeicida* infection from mean postlarval stage PL9 on ($p < 0.001$, see Table 2). However, susceptibility does not reach its maximum as soon as this stage: survival rates then decreased as mean postlarval stage increased, as demonstrated by Chi-square tests (see Table 3). Even though susceptibility increased among the older juveniles, it can be assumed that *P. stylirostris* stocks become susceptible to *V. penaeicida* infection from mean postlarval stage PL9 onward.

4. Conclusion

There was no significant effect of experimental infection by *V. penaeicida* until *P. stylirostris* stocks reached the mean postlarval stage PL9. From this stage onward, survival is significantly affected by *V. penaeicida* infection, therefore stocks of animals should be considered as juveniles regarding vibriosis. Mean postlarval stages before PL9 corresponded to stocks where most of the postlarvae do not have a definitive rostral

formula. In contrast, later stages corresponded to stocks where some or most of the animals should be considered juveniles because of their definitive rostral formula. Acquisition of susceptibility to *V. penaeicida* infection appears to be correlated with the acquisition of the definitive rostral formula. Postlarvae may be considered as resistant to *V. penaeicida* infection, however the animals become sensitive as soon as they reach the juvenile level, characterized by the definitive rostral formula. The last postlarval molt may therefore correspond to a real metamorphosis including some physiological and/or immunological modifications that would be responsible for the acquisition of this susceptibility. This shift in developmental stage associated with a sudden change in susceptibility is suggestive of the existence of specific receptor structures on shrimp cells that would be involved in one or more virulence mechanism(s) of *V. penaeicida* to *P. stylirostris*.

References

- Brock, J.A., LeaMaster, B., 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA, 212–226.
- Costa, R., Mermoud, I., Morlet, B., Haffner, P., Koblavi, S., Grimont, P., 1996. Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia: II. Isolation and identification of bacteria collected from the hemolymph of moribund prawns during peaks of mortality. In: World Aquaculture Society (Ed.), World Aquaculture '96. Book of abstracts of The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society, 29 January–2 February 1996, Bangkok, Thailand, p. 91.
- de la Peña, L.D., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T., Muroga, K., 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 115, 1–12.
- 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. In: World Aquaculture Society (Ed.), World Aquaculture '96. Book of abstracts of The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society, 29 January–2 February 1996, Bangkok, Thailand, p. 139.
- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., Limsuwan, C., 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health 6, 27–35.
- 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. In: World Aquaculture Society (Ed.), World Aquaculture '96. Book of abstracts of The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society, 29 January–2 February 1996, Bangkok, Thailand, p. 144.
- Lightner, D.V., 1988. *Vibrio* disease of Penaeid shrimp. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 17. Elsevier, Amsterdam, pp. 42–47.
- Lightner, D.V., 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 579–601.
- Mohney, L.L., Lightner, D.V., Bell, T.A., 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 25, 116–125.
- Prayitno, S.B., Latchford, J.W., 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. Aquaculture 132, 105–112.
- Sahul Hameed, A.S., 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like bacterium. Journal of the World Aquaculture Society 25, 315–319.

Publication n°3 :

Goarant, C. ; Herlin, J. ; Brizard, R. ; Marteau, A.-L. ; Martin, C. ; Martin, B. (2000) : Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 40: 101-107.

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

ECPs were prepared by filtration through 0.22 µm pore size filters (Sartorius) of culture supernatants after centrifugation at 5000 × *g* for 10 min at 4°C, according to Newman & Feng (1982). Control preparations were prepared using the same protocol with sterile culture medium. Sterility of all preparations was checked by spreading 100 µl of each preparation onto marine agar (2216 E, Difco) petri dishes and incubating this for 48 h at 30 ± 0.5°C.

Effect of temperature on *Vibrio penaeicida* ECPs. Sudden temperature drops are known to trigger Syndrome 93 episodes in New Caledonia. Therefore the toxicity of ECPs from New Caledonian *V. penaeicida* AM 101 was evaluated for cultures incubated at high (30 ± 0.5°C) and low (20 ± 1°C) temperatures. ECPs from *V. penaeicida* AM 101 cultured for 48 h at 20 and 30°C, and 22 h at 30°C were prepared as described above.

Enzymatic activities associated with ECPs. Enzymatic activities of ECPs were evaluated using API-zym test kits (Bio Mérieux, France). Each strip was filled with 65 µl of the ECP to be tested. The strip was then incubated for 4.5 h at 30°C. Readings were performed according to the manufacturer's instructions.

Cell lines. The fish cell line EPC, originating from carp epidermal herpes virus-induced hyperplastic lesions, was provided by CNEVA (Laboratoire de Pathologie des Animaux aquatiques, Brest, France). Shrimp cells were prepared from 15 juvenile (10 to 15 g) female penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* supplied by IFREMER-COP (Tahiti, French Polynesia).

The culture media consisted of (1) fish cells: Eagle's minimal essential medium (MEM; Sigma) buffered by 0.16 M Tris-HCl, pH 7.4 and supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) plus 200 i.u. penicillin and 200 µg streptomycin ml⁻¹; (2) shrimp cells: M 199 Medium (Sigma). All media (1×) in powder were reconstituted with 0.1 M NaCl and 0.01 M Tris buffer and pH was adjusted to 8.0 with HCl. The routine holding media (HM) consisted of 1 × M 199 medium with 1% of antibiotic-antimycotic solution (Sigma) containing 10⁴ units ml⁻¹ penicillin, 10 mg ml⁻¹ streptomycin, 25 µg ml⁻¹ amphotericin and supplemented with 10% FBS (Sigma). All heat-stable salt solutions were sterilized by autoclaving for 30 min at 121°C. Heat-labile media were filter sterilized using sterile 0.22 µm pore size filters (OSI, France).

Cell isolation and primary cultures. Primary cell cultures of ovary cells and haemocytes from *Litopenaeus stylirostris* were obtained as previously described (Le Groumellec et al. 1995). Briefly, shrimp were anaesthetized by being dipped in cold 5% hypochlorite solution for 5 min. The haemolymph (100 to 500 µl) was withdrawn from the ventral sinus using a 1 ml syringe, 26 gauge needle, containing an equal volume of anti-

coagulant solution (30 mM sodium citrate, 100 mM glucose, 350 mM NaCl, and 10 mM EDTA; pH 7). Ovaries were dissected out, washed twice in sterile medium (1×) with antibiotics (4 or 10×) during 1 h and then minced into pieces less than 1 mm in diameter with Pascheff scissors. Ovary fragments were directly transferred to 35 × 10 mm culture dishes (Nunc/Delta) containing 1.5 ml HM. Cultures were incubated at 26 ± 1°C and observed with a Leitz DMIL inverted microscope. Cell viability was determined using the trypan blue (1%) dye exclusion test.

In vitro assays for detection of toxic activities. The effect of the ECPs of the different *Vibrio* strains was assayed *in vitro* on shrimp ovarian and haemocyte primary cell cultures and EPC cell line cultures. Before determining the cytopathic effects of ECPs to primary cell cultures, the culture medium was replaced with fresh HM supplemented with antibiotics and FBS. Either an ECP preparation or control medium (5 µl) was then added to the cell culture dishes (1.5 ml). After 20 h of incubation for shrimp cells and 48 h for EPC cells, the cultures were fixed and stained using Giemsa's stain (30 s). The preparations were then observed for cytopathic effects using normal light microscopy. Each test was performed with 3 replicates.

In vivo assays for detection of toxic activities. Healthy juvenile *Litopenaeus stylirostris* (10 to 20 g mean weight) originating from the experimental Station d'Aquaculture de Saint Vincent (IFREMER, New Caledonia) were injected intramuscularly with 50 µl of either an ECP preparation or control medium. Between 5 and 7 injected shrimp were placed in 30 l aquaria filled with filtered seawater (25 ± 2°C; 35 ± 2 ppt salinity). Each experiment was conducted in at least 3 aquaria (i.e. 15 to 21 shrimp). Mortality was recorded over a 3 d period. Total haemocyte counts (THC) were performed as described by Le Moullac et al. (1997) on surviving C-stage animals at the end of this 3 d period. When mortality was excessive, a similar assessment of THC was conducted after a shorter period post injection.

Results of both mortality and THC measurements were analysed using StatView[®] software.

RESULTS

In vivo assays

With *Vibrio* strains cultured at 25°C

Survivals of ECP-injected shrimp are presented in Fig. 1. The ECPs from *Vibrio nigripulchritudo* AM 102 was lethal to *Litopenaeus stylirostris*: all injected shrimp died within a 24 h period following injection ($\chi^2 = 56.46$; $p < 0.001$). Lethal toxicity was not demonstrated *in vivo*

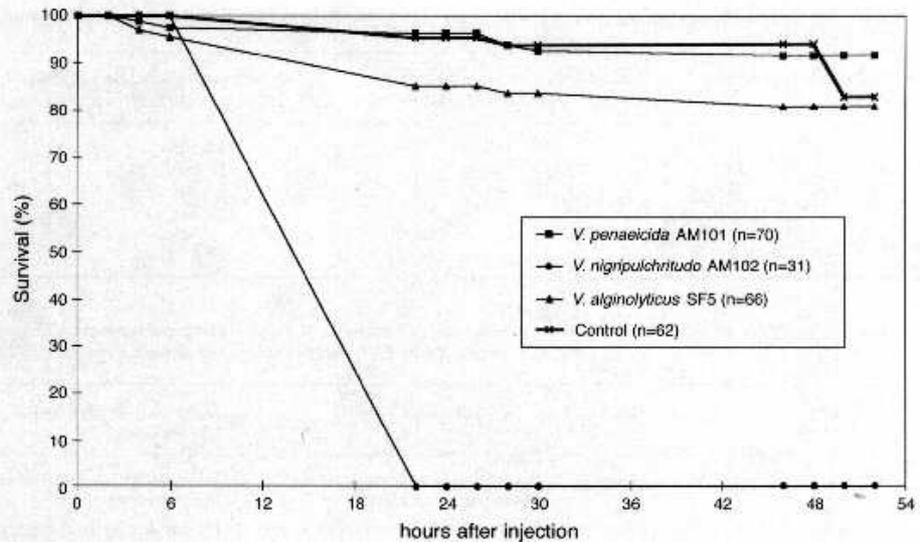


Fig. 1. Survival of juvenile *Litopenaeus stylirostris* injected with extracellular products (ECPs) from *Vibrio* strains cultured at 25°C. Values in the parentheses indicate the number of shrimp for each preparation

for *V. penaeicida* AM 101 ($\chi^2 = 3.37$; $p = 0.12$) and *V. alginolyticus* SF 5 ($\chi^2 = 0.08$; $p = 0.78$) cultured at 25°C. Total haemocyte counts did not demonstrate any toxic activity for *V. penaeicida* AM 101 and *V. alginolyticus* SF 5 supernatants ($F = 0.10$; $p = 0.91$). The THC from control and *V. nigripulchritudo* ECP-injected animals are presented in Fig. 2. A significant decrease in THC was observed in *V. nigripulchritudo* ECP-injected shrimp 3 h after injection ($t = 5.14$; $p < 0.01$). At the end of the experiment, the surviving shrimp showed a

3-fold decrease in THC compared to control shrimp ($t = 3.52$; $p < 0.01$). This result suggested the possible presence of haemocytolytic activity in the ECPs from *V. nigripulchritudo* AM 102.

With *Vibrio penaeicida* cultured at 20 or 30°C

The effect of culture temperature on *Vibrio penaeicida* AM 101 ECP toxicity is shown in Table 1. Cultures

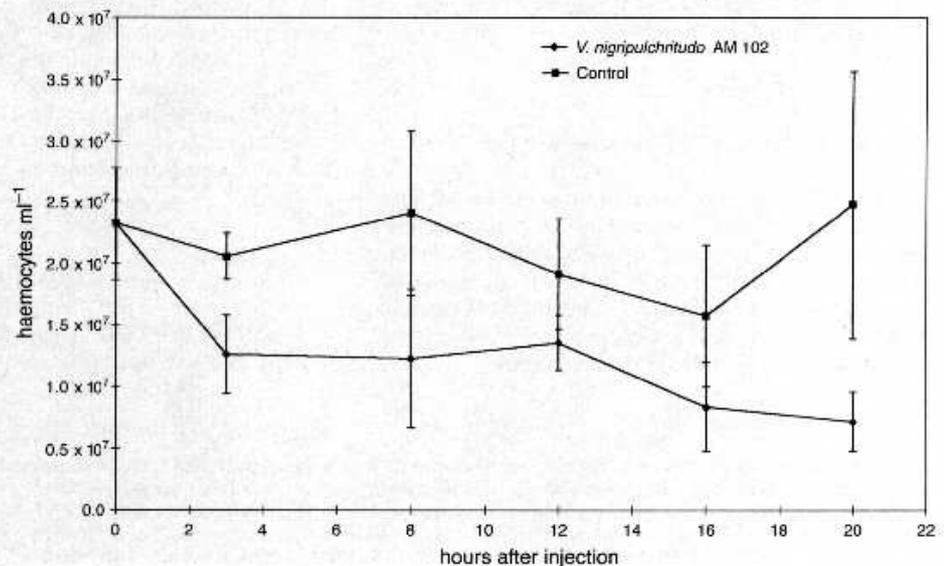


Fig. 2. Total haemocyte counts of different juvenile *Litopenaeus stylirostris* following injection with either ECPs from cultured *Vibrio nigripulchritudo* AM 102 or control medium. Each value corresponds to the average THC from 5 to 10 C-stage shrimp. Bars: standard deviation

Table 1. Survival of *Litopenaeus stylirostris* injected with ECPs from *Vibrio penaeicida* AM 101 cultured at different temperatures

Culture temperature (°C)	Initial cell concentration (CFU ml ⁻¹) (culture duration [h])	No. of injected shrimp (no. of aquaria)	Survival of ECP-injected shrimp (%)
30	10 ^{8.2} (48 h)	42 (6)	95
30	10 ^{7.9} (22 h)	42 (6)	100
20	10 ^{7.9} (48 h)	42 (6)	0 ^a
Control	0	21 (6)	95

^aMedian time to death: 12.5 h

Table 2. Cytopathological effects on cell cultures incubated with ECPs of shrimp-pathogenic *Vibrio* strains that were cultured at 25°C (Giemsa's stain). EPC: epithelioma papulosum cyprini

ECP origin	Fish cell line EPC	<i>Litopenaeus stylirostris</i> ovary cells	<i>Litopenaeus stylirostris</i> haemocytes
<i>V. penaeicida</i> AM 101	Normal	Altered cell structure, naked nuclei, karyorrhexis	Obliteration of cellular boundaries, karyorrhexis
<i>V. nigripulchritudo</i> AM 102	Normal	Fragmented cytoplasm, karyorrhexis and marginated chromatin	Naked nuclei and fragmented cytoplasm, obliteration of cellular boundaries, flocculated cytoplasm
<i>V. alginolyticus</i> SF 5	Normal	Cells surrounded by lipid drops	Fragmented cytoplasm and marginated chromatin
Control (no ECPs)	Normal	Normal	Normal

incubated at 30°C grew faster, but their ECPs (either same culture duration or same initial cell density) showed no lethal activity when injected into healthy juvenile shrimp, whereas 100% mortality was induced by injecting shrimp with ECPs from cultures of *V. penaeicida* AM 101 incubated at 20°C. The toxic factor was demonstrated to be heat-labile because heating the ECPs (80°C; 10 min) considerably reduced its lethality. However, when another clone of this same strain, *V. penaeicida* AM 101, was cultured at 20 or 30°C, low mortalities were obtained (Ph. Haffner pers. comm.).

Enzymatic activities associated with ECPs

All tested ECPs showed strong to moderate alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, phosphohydro-lase, N-acetyl-β glucosaminidase and acid phosphatase activities. *Vibrio penaeicida* ECPs showed light trypsin activity. No enzymatic pattern of ECPs could be linked to the toxic effects. Furthermore, these patterns were unaffected by culture temperatures.

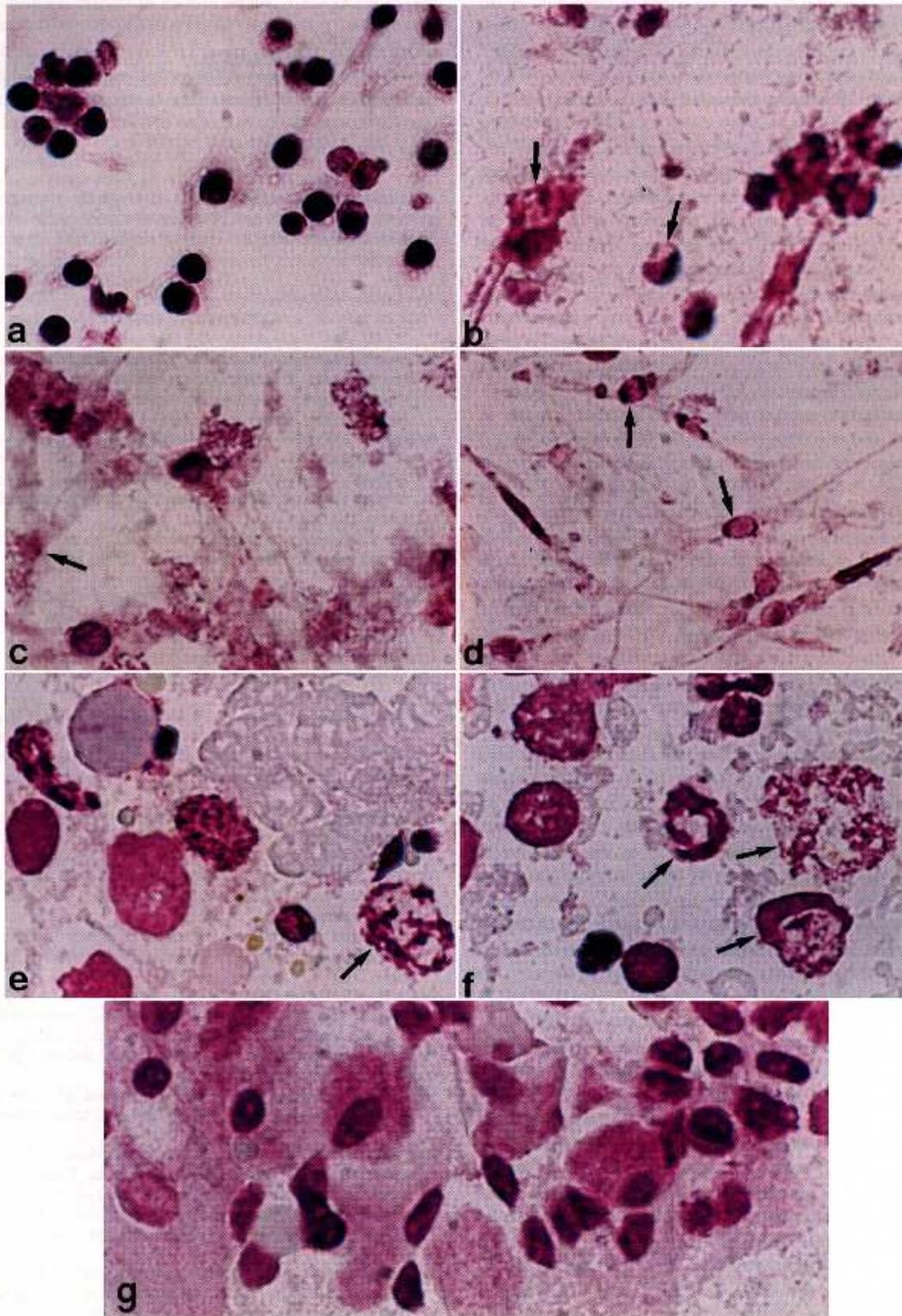
In vitro assays

None of the ECPs of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp were cytotoxic for the fish cell line EPC. By contrast, cytopathic effects caused by ECPs from *Vibrio* strains pathogenic to shrimp were observed in cell monolayers derived from haemocytes and ovarian tissue (Fig. 3). All ECPs induced cytopathic effects in haemocyte primary cell cultures. Obliteration of cellular boundaries, karyorrhectic nuclei and marginated chromatin were noticed after Giemsa staining (Fig. 3, Table 2). In primary cultures of ovarian cells, the most significant cytopathic effects were induced by ECPs from *V. penaeicida* AM 101 and *V. nigripulchritudo* AM 102; ECPs from *V. alginolyticus* SF 5 induced much less of a cytopathic effect in these cultures (Fig. 3, Table 2).

DISCUSSION

Toxicity of ECPs was demonstrated for shrimp-pathogenic *Vibrio* strains by *in vitro* assays. The inevitable

Fig. 3. *In vitro* assays for detection of toxic activities with ECPs of shrimp-pathogenic *Vibrio* strains cultured at 25°C; cell sheets derived from haemocytes and ovarian tissue of *Litopenaeus stylirostris* (×800; Giemsa staining). Arrows show nuclei in the process of karyolysis. (a) Control haemocytes ('exotoxin control'); (b–d) haemocytes with ECP of (b) *V. penaeicida* (AM 101), (c) haemocytes with ECP of *V. nigripulchritudo* (AM 102), and (d) *V. alginolyticus* (SF 5); (e) ovarian cells with ECP of *V. penaeicida* (AM 101) and (f) *V. nigripulchritudo* (AM 102); (g) control ovarian cells ('exotoxin control')



contamination of the ECPs by some lipopolysaccharide (LPS) might be responsible for some of the alterations observed in haemocyte primary cell cultures, possibly via activation of the prophenoloxidase system (Söderhäll & Häll 1984). On the other hand, the cytopathic effects observed in ovarian cells were most probably due to the toxic effect of other components of the ECPs, even though some haemocytes were inevitably present in these cultures. Using *in vivo* assays, ECP toxicity was demonstrated only for the very pathogenic *V. nigripulchritudo* AM 102 and for *V. penaeicida* AM 101 cultured at cooler temperatures (20°C). Their ECPs were lethal for shrimp. The toxic factor present in *V. penaeicida* AM 101 was demonstrated to be heat-labile and might correspond to an exotoxin since LPSs are relatively heat-stable. Haemolysins have been demonstrated in various *Vibrio* strains (Rodrigues et al. 1993), including strains pathogenic to fish (Toranzo et al. 1983) and shellfish (Nottage & Birkbeck 1987), and have frequently been correlated with virulence (Kreger 1984, Fouz et al. 1993, Chakraborty et al. 1997, Fiore et al. 1997). Proteases have also been implicated as virulence factors in various *Vibrio* strains pathogenic to fish (Norqvist et al. 1990) or shrimp (Lee et al. 1997, Liu & Lee 1999). The toxic activities we describe here seem to be specific, as no cytopathic effect of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp was noted with the fish cell line tested. These *in vitro* assays demonstrate the usefulness of primary cell cultures from penaeid shrimp in the study of virulence mechanisms and especially the cytotoxic factors of shrimp bacterial pathogens. Thus, *in vitro* assays appear more sensitive than *in vivo* assays. A wide range of enzymatic activities were demonstrated in the ECPs but it was not possible to link one specific enzymatic pattern with the toxic activity. Though most of these exoenzymes are considered as putative virulence factors by some authors (Borrego et al. 1996), their presence in culture supernatants could not be related to virulence in the present study.

The excretion of exotoxins has been demonstrated to be phase-dependent in various bacterial species or isolates, including *Pseudomonas aeruginosa* (Liu 1957) and *Vibrio vulnificus* (Kreger & Lockwood 1981). We also found that ECP toxicity for some *V. penaeicida* clones was phase- or temperature-dependent. Temperature is often associated with regulation of virulence factors in bacterial pathogens (Finlay & Falkow 1997). However, virulence often increases when the temperature increases. In this study, ECP virulence was observed when the temperature decreased. The physiological significance of this phenomenon remains to be studied, but could correspond to an adaptive response to cold temperatures, as demonstrated in *V. vulnificus* by Bryan et al. (1999). It was not possible here to determine whether *V. penaeicida* AM 101 ECP

toxic factors were not produced at higher temperatures or whether they were simply degraded in the culture broth by an exoenzyme excreted (or active) at higher temperatures. However the occurrence of ECP toxicity in cultures incubated at low temperatures seems to correlate with the occurrence of Syndrome 93 episodes after temperature drops.

Acknowledgements. This work was partly supported by grants from the North and South Provinces of New Caledonia. Thanks are due to Phillippe Haffner (AQUACOP) for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Borrego JJ, Luque A, Castro D, Santamaria JA (1996) Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat Living Resour* 9:125–136
- Brock JA, LeaMaster B (1992) A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: Wyban J (ed) *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p 212–226
- Brown C, Roland G (1984) Characterization of exotoxin produced by a shellfish pathogenic *Vibrio* sp. *J Fish Dis* 7: 117–126
- Bryan PJ, Steffan RJ, DePaola A, Foster JW, Bej AK (1999) Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol* 38:168–175
- Chakraborty S, Nair GB, Shinoda S (1997) Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Rev Environ Health* 12:63–80
- Costa R, Mermoud I, Koblavi S, Morlet B, Haffner P, Berthe F, Le Groumellec M, Grimont P (1998) Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164:297–309
- Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 31:136–169
- Fiore AE, Michalski JM, Russel RG, Sears CL, Kaper JB (1997) Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 65:3112–3117
- Fouz B, Barja JL, Amaro C, Toranzo AE (1993) Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Curr Microbiol* 27:341–347
- Fouz B, Toranzo AE, Biosca EG, Mazoy R, Amaro C (1994) Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol Lett* 121:181–182
- Kreger AS (1984) Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect Immun* 44:326–331
- Kreger AS, Lockwood D (1981) Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 33: 583–590
- Lee KK, Yu SR, Liu PC (1997) Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr Microbiol* 34:110–117
- Le Groumellec M, Martin C, Haffner P, Martin B, Aquacop (1995) Cell culture from tropical shrimps. *J Aqua Trop* 10: 277–286
- Le Moullac G, Le Groumellec M, Ansquer D, Froissard S, Lévy P, Aquacop (1997) Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in

- relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 7:227-234
- Lightner DV (1988) *Vibrio* disease of Penaeid shrimp. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. In: Sindermann CJ, Lightner DV (eds) *Developments in aquaculture and fisheries science*. Elsevier, Amsterdam, p 42-47
- Liu PC, Lee KK (1999) Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* 28:428-430
- Liu PV (1957) Survey of hemolysin production among species of Pseudomonads. *J Bacteriol* 74:718-727
- Mohney LL, Lightner DV, Bell TA (1994) An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei*. *J World Aquacult Soc* 25:116-125
- Newman MC, Feng SY (1982) Susceptibility and resistance of the rock crab, *Cancer irroratus*, to natural and experimental bacterial infection. *J Invertebr Pathol* 40:75-88
- Nishibuchi M, Seidler RJ (1983) Medium-dependent production of extracellular enterotoxins by non-O-1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. *Appl Environ Microbiol* 45:228-231
- Norqvist A, Norrman B, Wolf-Watz H (1990) Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* 58:3731-3736
- Nottage AS, Birkbeck TH (1986) Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain NCMB 1338 and other marine *Vibrio*. *J Fish Dis* 9:249-256
- Nottage AS, Birkbeck TH (1987) The role of toxins in *Vibrio* infections of bivalve molluscs. *Aquaculture* 67:244-246
- Pedersen K, Dalsgaard I, Larsen JL (1997) *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Appl Environ Microbiol* 63:3711-3715
- Rodrigues DP, Ribeiro RV, Alves RM, Hofer E (1993) Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:589-592
- Söderhäll K, Häll L (1984) Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochem Biophys Acta* 797:99-104
- Toranzo AE, Barja JL, Colwell RR, Hetrick FM, Crosa JH (1983) Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic Coast. *FEMS Microbiol Lett* 18:257-262

Editorial responsibility: Timothy Flegel,
Bangkok, Thailand

Submitted: May 2, 1999; Accepted: December 13, 1999
Proofs received from author(s): March 2, 2000

Publication n° 4 :

Goarant, C. ; Brizard, R. ; Marteau, A.-L. (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.



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

being the presence of white spots on the cuticle. Yet in some cases, there is neither evidence of viral aetiology, nor mortality, though susceptible species are concerned.

In May 1997, some white spot lesions evoking the white spot disease were observed in reared Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* broodstock in New Caledonia. The occurrence of these lesions was associated with neither mortality, nor histological evidence of white spot syndrome baculovirus (WSBV), though *L. stylirostris* is a sensitive species to WSBV infection (Lightner et al., 1998). Because of the external aspect of the lesions, it was hypothesised that they could be a form of bacterial shell disease (Cook and Lofton, 1973). The aim of this study was to investigate this hypothesis, and to investigate if these lesions could be routes of entry of other bacterial pathogens. Bacterial examination of both the cuticular epibiotic flora and the haemolymph flora was carried out using conventional methods.

2. Material and methods

2.1. Animals, lesions grading and molt staging

Juvenile *L. stylirostris* from our collection fixed in Davidson's (1995–1997) were dissected. Direct and microscopic examination for the presence of white lesions on the cuticle was carried out. Broodstock *L. stylirostris* originating from the "Ecloserie du Nord" Hatchery (Koné, New Caledonia), where the lesions were observed for the first time, were either examined directly at the hatchery laboratory (direct and microscopic examination) or brought alive to our laboratory for a long-term observation. The animals were held in a 2-m³ concrete pond with periodic water exchange (37 ppt salinity), progressive water heating (25°C to 30°C), and fed ad libitum with a complete commercial diet. These animals were periodically examined for molt stage and lesion grading. Some of them were examined bacteriologically and discarded.

Lesions were graded from 0 to 3 depending upon their abundance and diameter, after microscopic examination of the carapace (magnification: ×25). Dissected shells were also observed under the light microscope for the general appearance of the lesion. Molt stages of the examined shrimp were determined according to Drach (1939) and Chan et al. (1988).

2.2. Bacterial media, epibiotic and haemolymph bacterial flora

TCBS agar (for presumptive Vibrionaceae flora) and Marine Agar 2216 (for total heterotrophic flora) both from Difco Laboratories were used for this study. A colloidal suspension of chitin was added to the marine agar before use (Hansen and Sørheim, 1991). The epibiotic bacterial flora were collected by rubbing a 0.5-cm² carapace shell, after rinsing it with sterile seawater. The epibiotic flora was streaked directly onto agar plates. After rinsing the shrimp with sterile seawater, haemolymph was withdrawn from

the ventral sinus using a sterile tuberculin syringe and needle. One drop of haemolymph was placed aseptically onto the agar plates and spread with a sterile loop. Colony

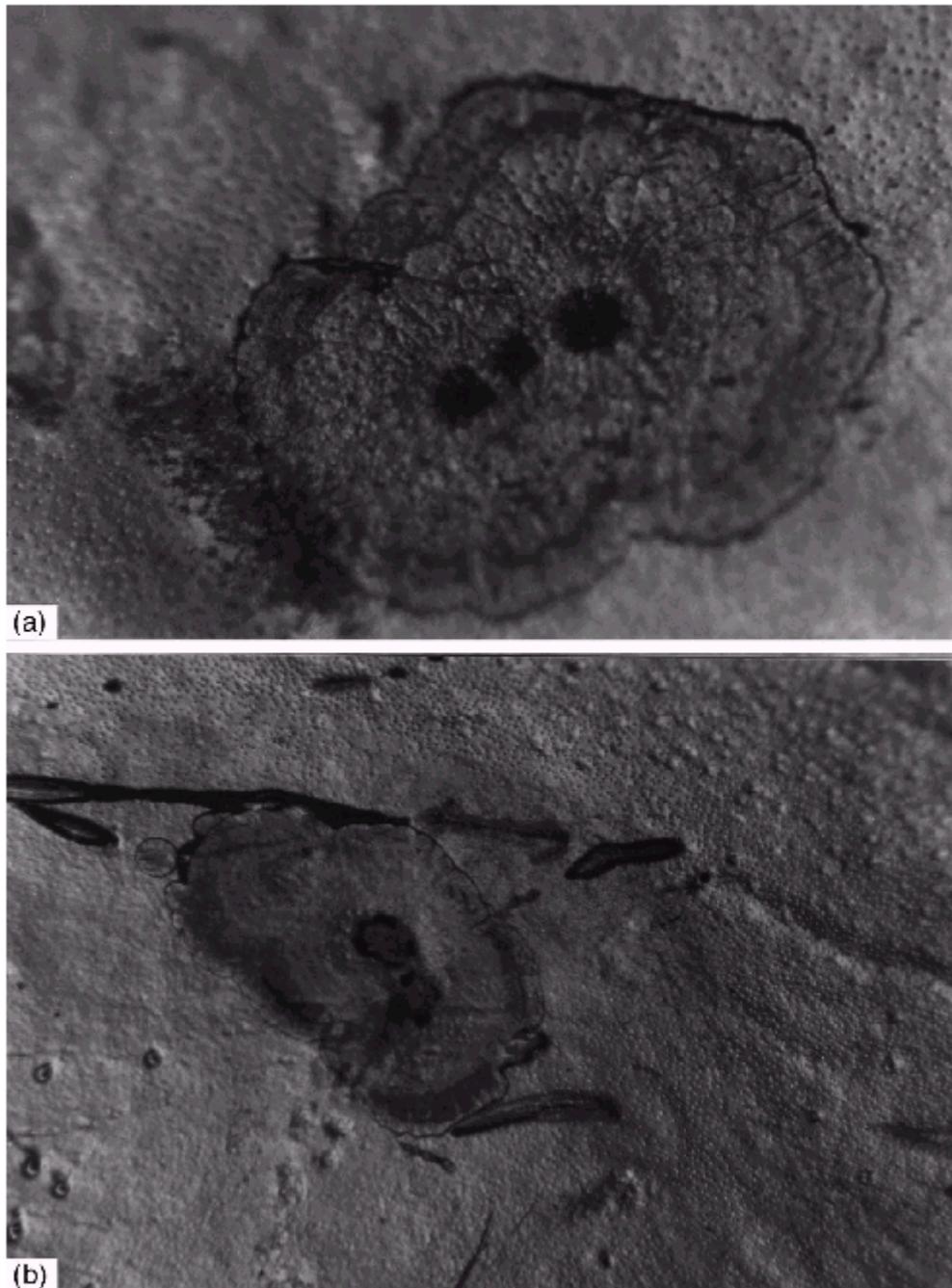


Fig. 1. Microscopic view of the white spot lesions observed on cuticles of *Litopenaeus stylirostris* broodstock (a). Some show a small melanisation area (b; arrows). Bars indicate 1.0 mm. Magnification: $\times 50$.

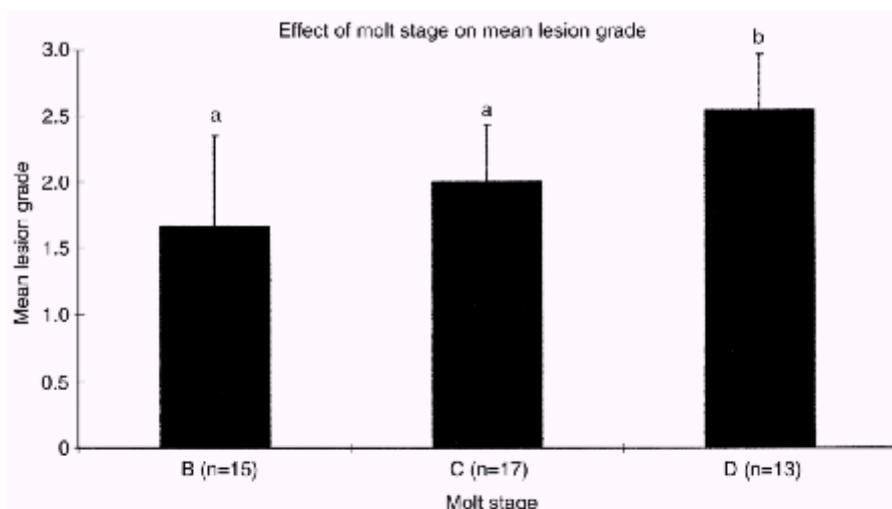


Fig. 2. Effect of molt stage on mean white spot grade. Bars represent 95% confidence intervals. Bars showing the same letter do not differ significantly (n = indicates the number of animals from each molt stage).

forming units were counted after 24 h (for TCBS) to 5 days (for marine agar) incubation at 30°C. Results were analysed by using Stat View[®] software.

3. Results

The lesions induce a fragility through thinning the cuticle. The microscopic examination shows that the lesions seem to spread from an initial wound. The more extensive lesions showed a small melanised centre (Fig. 1b, arrows), evoking the bacterial shell disease (Cook and Lofton, 1973). The same lesions were frequently observed on collection animals fixed in Davidson's in the years 1995 to 1997. Animals originating from growout ponds had similar but frequently smaller lesions. Broodstock animals kept at the laboratory showed an increase in mean lesion grade when heating seawater from 25°C to 30°C ($F = 10.32$; $p < 0.01$) and through the molt cycle (Fig. 2). In late D stage animals, the dissection allowed to show that the lesions were absent from the future cuticle. Males and females had similar lesions ($t = 0.536$; $p = 0.59$). The study also demonstrated a positive correlation between lesion grade and cuticular total heterotrophic flora ($F = 17.411$; $p < 0.001$). Presumed *Vibrio* levels (isolated on TCBS agar) were low in haemolymph and found only in affected animals. Chitinoclastic bacteria, as demonstrated by a halo surrounding the colony on chitin marine agar, were present on almost all cuticles and were not significantly related to the grade of the lesions. They were also more abundant in haemolymph of affected animals ($p = 0.17$).

4. Discussion

The presence of a more extensive epibiotic bacterial flora on diseased cuticles demonstrates that these lesions are external. There was an increased prevalence of the

lesions through the molt cycle as shown by the mean lesion grades. Furthermore, the underlying future cuticle of late D stage animals was unaffected. It demonstrates that the molt process allows the disappearance of the lesions. Broodstock animals had the largest lesions, probably because they molt less frequently, their cuticle being therefore exposed for longer periods of time, as hypothesised by Getchell (1989) for shell disease in crabs. An increase in prevalence was observed when the water temperature in the maturation facilities at the “Écloserie du Nord” Hatchery was increased to 30°C as to induce maturation in broodstock females. This observation was confirmed in the laboratory and also demonstrated that this phenomenon was not related to the sex of the animals. Sindermann (1988), reporting on the “shell disease” in the blue crab (*Callinectes sapidus*), stated that this disease increases with temperature. These elements allow to hypothesise that the lesions mentioned in this study correspond to a form of bacterial shell disease. A microscopic observation permits the differentiation of the lesions caused by this presumed bacterial shell disease and the WSBV-associated lesions: in the shell disease, the lesion is external, results in a thinning and an increased fragility of the cuticle and sometimes melanisation of the underlying tissues (Cook and Lofton, 1973; Sindermann, 1988; Getchell, 1989), whereas in the WSBV-associated lesions, the lesions are calcium deposits on the inner surface of the cuticle (Lightner, 1996), and no melanisation occurs in the underlying tissues.

5. Conclusion

The observations described in this study seem to demonstrate that the white spot lesions observed on *L. stylirostris* broodstock are a form of localised bacterial shell disease, which rarely results in perforation of the cuticle. When the cuticle is punched, a melanised zone appears, and the lesion looks like a traditional shell disease named “black spot” or “brown spot disease” (Lightner, 1988). AQUACOP (1984) reported a “white shell spot disease” in *L. stylirostris*, *L. vannamei* and *Fenneropenaeus merguensis*. These lesions were most often seen in female broodstock in maturation facilities, when increasing water temperature, and were not associated with any mortality (J. Patrois, IFREMER-COP, BP 7004 Tahiti, French Polynesia, pers. com.). These lesions were most probably identical to the lesions described in this study.

Acknowledgements

This work was partly supported by grants from the North and South Provinces of New Caledonia.

References

- AQUACOP, 1984. Review of ten years of experimental Penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). J. World Maric. Soc. 15, 73–91.
- Chan, S.M., Rankin, S.M., Keeley, L.L., 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biol. Bull. 175, 185–192.

- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Lo, C.-F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23, 165–173.
- Cook, D.W., Lofton, S.R., 1973. Chitinoclastic bacteria associated with shell disease in *Penaeus* shrimp and the blue crab (*Callinectes sapidus*). *J. Wildl. Dis.* 9, 154–159.
- Drach, P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Annales de l'Institut Océanographique de Paris N.S.* 19, 103–391.
- Getchell, R.G., 1989. Bacterial shell disease in Crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 8, 1–6.
- Hansen, G.H., Sørheim, R., 1991. Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. *J. Microbiol. Methods* 13, 231–241.
- Lee, K.K., Yu, S.-R., Chen, F.-R., Yang, T.-L., Liu, P.-C., 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. *Curr. Microbiol.* 32 (4), 229–231.
- Lightner, D.V., 1988. Bacterial shell (brown spot) disease. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 17. Elsevier, Amsterdam, pp. 48–51.
- Lightner, D.V., 1996. White spot syndrome baculovirus complex. In: Lightner, D.V. (Ed.), *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Lightner, D.V., Hasson, K.W., White, B.L., Redman, R.M., 1998. Experimental infection of western hemisphere Penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health* 10, 271–281.
- Limsuwan, C., 1997. What kind of white spot kills shrimp?. *AAHRI Newsl.* 6, 4–5.
- Sindermann, C.J., 1988. Shell disease. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 17. Elsevier, Amsterdam, pp. 194–196.
- Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda, M., Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K., Boonyaratpalin, S., 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.* 29, 121–125.
- Wang, C.H., Lo, C.-F., Leu, J.-H., Chou, C.-M., Yeh, P.-Y., Chou, H.-Y., Tung, M.-C., Chang, C.-F., Su, M.-S., Kou, G.-H., 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 23, 239–242.

Bibliographie

- Adiyodi, K.G. ; Adiyodi, R.G. (1970) : Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 45:121-165
- Alabi, A.O. ; Jones, D.A. ; Latchford, J.W. (1999) : The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. Aquaculture. 178. 1-11
- Alday de Graindorge, V. ; Flegel, T.W. (1999) : CD-Rom: Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Rome: FAO et Multimedia Asia Co., Ltd.
- Amaro, C. ; Biosca, E.G. ; Fouz, B. ; Toranzo, A.E. ; Garay, E. (1994) : Role of iron, capsule, and toxins in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus* biotype 2 for mice. Infection and Immunity. 62. 2. 759-763
- Anonyme. (1998) : Le développement de l'aquaculture de crevettes de mer en Nouvelle-Calédonie. Nouméa: Station d'Aquaculture de Saint Vincent.
- AQUACOP. (1979) : Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *Penaeus monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proc. World Maricul. Soc. 10:445-452
- AQUACOP. (1979) : Définition et Prévention du complexe d'aquaculture intensive. Document interne IFREMER.
- AQUACOP. (1975) : Maturation and spawning in captivity of Penaeid shrimp: *P. merguensis* de Man, *P. japonicus* Bate, *P. aztecus* Ives, *M. ensis* de Hann, and *P. semisulcatus* de Hann. Proc. World Maricul. Soc. 6:123-132
- Austin, B. ; Austin, D.A. (1993) : Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish. Second edition. New York. Ellis Horwood.
- Austin, B. ; Alsina, M. ; Austin, D.A. ; Blanch, A.R. ; Grimont, F. ; Grimont, P.A.D. ; Joffre, J. ; Koblavi, S. ; Larsen, J.L. ; Pedersen, K. ; Tiainen, T. ; Verdonck, L. ; Swings, J. (1995) : Identification and typing of *Vibrio anguillarum* : A comparison of different methods. Syst. Appl. Microbiol. 18:285-302
- Aznar, R. ; Ludwig, W. ; Schleifer K-H. (1993) : Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. System. Appl. Microbiol. 16:303-309

- Bauchau, A.G. ; Mengeot, J.C. (1978). Structure et fonction des hémocytes chez les Crustacés. Arch. Zool. exp. gén. 119. 227-248
- Baudin-Laurencin, F. (1987) : Pathogénie de la vibriose: un exemple des relations entre organisme pathogène, hôte et environnement. Océanis. 13. 115-123
- Berthe, F. (1995) : Rapport sur la pathologie des Pénéides en Nouvelle-Calédonie ; état et perspectives du programme d'assistance à la filière crevette de Nouvelle-Calédonie par la recherche en pathologie. GIE-RA Nouméa. Document interne IFREMER.
- Biosca, E.G. ; Llorens, H. ; Garay, E. ; Amaro, C. (1993) : Presence of a capsule in *Vibrio vulnificus* biotype 2 and its relationship to virulence for eels. Infection and Immunity. 61. 1611-1618
- Boemare, N. ; Cousserans, F. ; Bonami, J.R. (1978) : Epizootie à Vibrionaceae dans les élevages de crevettes Penaeidae. Ann. Zool. Ecol. anim. 10(2): 227-238
- Boom, R. ; Sol, C.J.A. ; Salimans, M.M.M. ; Jansen, C.L. ; Wertheim-van Dillen ; van der Noordaa, J. (1990) : Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28:495-503
- Borrego, J.J. ; Luque, A. ; Castro, D. ; Santamaria, J.A. (1996) : Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philipinarum*. Aquat Living Resour 9: 125-136
- Brauns, L.A. ; Hudson, M.C. ; Oliver, J.D. (1991) : Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and non-culturable *Vibrio vulnificus* cells. Applied and Environmental Microbiology. 57. 2651-2655
- Brenner, D.J. ; McWhorter, A.C. ; Leete Knuston, J.K. ; Steigerwalt A.G. (1982) : *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. J. Clin. Microbiol. 15:1133-1140
- Brock, J.A. (1988) : Black spot disease. in Developments in aquaculture and fisheries science, vol. 17. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture.. C.J. Sindermann and D.V. Lightner, editors. Elsevier. pp.151-153
- Brock, J.A. ; Lea Master, B. (1992) : A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. Pages 212-226 in Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.

- Browdy, C.L. (1998) : Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture*. 164. 3-21
- Brown, C. ; Roland, G. (1984) : Characterization of exotoxin produced by a shellfish pathogenic *Vibrio* sp. *Journal of Fish Diseases*7: 117-126
- Brown, J.H. (1989) : Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture* 20: 34-49
- Carman, K.R. ; Dobbs, F.C. (1997) : Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microscopy Research and Technique*. 37. 2. 116-135
- Chevassus, B. ; Dorson, M. (1990) : Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture*. 85. 83-107
- CNEXO Aquaculture Team. 1974. Maturation and spawning in captivity of Penaeid prawns: *P. merguensis* de Man, *P. japonicus* Bate, *P. aztecus* Ives and *Metapenaeus ensis* (de Haan). 17 pages. Paris: Rapport CNEXO.
- Coatanéa DF, Farman RS, Galinié CP. 1997. Shrimp aquaculture in New Caledonia: socio-economical aspects. *in* . Book of abstracts, Island aquaculture and tropical aquaculture; 1997 May 4-1997 May 9; Les trois iles, Martinique, F.W.I. p. 83
- Colwell, R.R. ; Grimes, D.J. (1984) : *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgolander Meeresuntersuchungen*. 37. 265-287
- Colwell, R.R. ; Huq, A. (1999) : Global microbial ecology: biogeography and diversity of *Vibrios* as a model. *Journal of Applied Microbiology*. 85 Suppl. S. 134S-137S
- Colwell, R.R. (1983) : *Vibrios* in the environment. John Wiley & Sons. New York. 625 pp.
- Compère, Ph. (1988) : Mise en place de l'épicuticule chez le Crabe *Carcinus maenas*. *in* Aspects récents de la biologie des Crustacés. Actes de Colloques-8-IFREMER, pp 47-54
- Conchas, R.F. ; Lemos, M.L. ; Barja, J.L. ; Toranzo, A.E. (1991) : Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology*. 57. 2956-2962
- Cook, D.W. ; Lofton, S.R. (1973) : Chitinoclastic bacteria associated with shell disease in *Penaeus* shrimp and the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 9. 154-159

- Costa, R. ; Mermoud, I. ; Koblavi, S. ; Morlet, B. ; Haffner, P. ; Berthe, F. ; Le Groumellec, M. ; Grimont, P. (1998 b) : Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164 : 297-309
- Costa, R. ; Mermoud, I. ; Mari, J. ; Bonami, J.R. ; Hasson, K. ; Lightner, D.V. (1998 a) : Investigations on a disease of *Penaeus stylirostris* (Syndrome 93) in New Caledonia, exploring a viral hypothesis. *Aquaculture*, 164 : 311-322
- Crosa, J.H. ; Schiewe, M.H. ; Falkow, S. (1977) : Evidence for a plasmid contribution to the virulence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*. 18. 509-513
- Crosa, J.H. ; Hodges, L.L. ; Schiewe, M.H. (1980) : Curing of plasmids is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*. 27. 897-902
- Cutrin, J.M. ; Toranzo, A.E. ; Barja, J.L. (1995) : Genetic transformation of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*. 128. 1. 75-80
- De La Cruz, M. ; Muroga, K. (1989) : The effects of *Vibrio anguillarum* extracellular products on Japanese eels. *Aquaculture*. 80. 201-210
- de la Peña, L.D. ; Nakai, T. ; Muroga, K. (1995) : Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology*. 30. 39-45
- de la Peña LD, Momomaya K, Nakai T, Muroga K (1992) Detection of the causative agent of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol. - Gyoby Kenkyu*. 244: 223-228
- Enger, Ø. ; Husevag, B. ; Goksoyr, J. (1991) : Seasonal variation in presence of *Vibrio salmonicida* and total bacterial counts in norwegian fish farm water. *Canadian Journal of Microbiology*. 37. 618-623
- Fast AW, Lester LJ, éditeurs. 1992. *Marine shrimp culture: principles and practices*. Volume 23, *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier: Amsterdam
- Fast AW. 1992. *Penaeid growout systems: an overview*. in : Fast AW, Lester LJ, *Marine shrimp culture: principles and practices*. Volume 23, *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier: Amsterdam. p 345-354
- Finlay, B.B. ; Falkow, S. (1997) : Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 31: 136-169

- Fisher, W.S. (1988) : Shell disease. *in* Developments in aquaculture and fisheries science, vol. 17. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture.. C.J. Sindermann and D.V. Lightner, editors. Elsevier. pp.236-239
- Fjalestad, K.T. ; Gjedrem, T. ; Gjerde, B. (1993) : Genetic improvement of disease resistance in fish : an overview. *Aquaculture*. 111. 65-74
- Forbes A. 1992. Penaeid larviculture: small-scale Asian hatcheries. *in* : Fast AW, Lester LJ, Marine shrimp culture: principles and practices. Volume 23, Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier: Amsterdam. Pp. 217-224
- Fouz, B. ; Barja, J.L. ; Amaro, C. ; Toranzo, A.E. (1993) : Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Current Microbiology* 27: 341-347
- Fouz, B. ; Toranzo, A.E. ; Biosca, E.G. ; Mazoy, R. ; Amaro, C. (1994) : Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiology Letters* 121: 181-182
- Giles, J.S. ; Hariharan, H. ; Heaney, S.B. (1995) : The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. 41. 209-216
- Giorgetti, G. (1990) : Diseases problems in farmed Peneids in Italy. *in* Advances in tropical aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia, February 20 - March 4, 1989. IFREMER Actes de colloques n°9, 1990. pp. 75-87
- Gjedrem, T. ; Salte, R. ; Gjoen, H.M. (1991) : Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*. 97. 1-6
- 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.
- 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. Poster de présentation générale du Syndrome 93 au congrès annuel de la World Aquaculture Society, 29 janvier au 2 février 1996, Bangkok.
- Goffinet, G. ; Jeuniaux, Ch. (1994) : Le tégument : morphologie et biochimie. *in* Traité de zoologie. Crustacés. Tome VII, fascicule I. Masson editeur, 1994. Pp. 49-90

- Grassé PP. 1994. Traité de zoologie ; Anatomie, systématique, biologie. Crustacés. Tome VII, Fascicule I. Masson: Paris.
- Grimont, F. ; Grimont, P.A.D. (1986) : Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur / Microbiol. 137B. 165-175
- Grimont, P.A.D. ; Grimont, F. (1996) : Apport de la biologie moléculaire au typage : données méthodologiques. Méd. Mal. Infect. 26: 379-385
- Hansen, G.H. ; Sorheim, R. (1991) : Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. Journal of microbiological methods. 13. 231-241
- Hauton, C. ; Williams, J.A. ; Hawkins, L.E. (1997) : The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 211. 115-128
- Høi, L. ; Dalsgaard, A. ; Larsen, J.L. ; Warner, J.M. ; Oliver, J.D. (1997) : Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*. Applied and Environmental Microbiology. 63: 1674-1678
- Holmes, D. ; Quigley, M. (1981) : A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197
- Huq, A. ; Small, E.B. ; West, P.A. ; Huq, M.I. ; Rahman, R. ; Colwell, R.R. (1983) : Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Applied and Environmental Microbiology. 45. 275-283
- Ishimaru, K. ; Akagawa-Matsushita, M. ; Muroga, K. (1995) : *Vibrio penaeicida* sp.nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). International Journal of Systematic Bacteriology. 45. 1. 134-138
- Itami T. ; Yan Y. ; Takahashi Y. (1992 a) : Studies on vaccination against vibriosis in cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. I. Effect of vaccine concentration and duration of vaccination efficacy. Journal of Shimonoseki University of Fisheries. 40. 83-87
- Itami T. ; Yan Y. ; Takahashi Y. (1992 b) : Studies on vaccination against vibriosis in cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. II. Effect different vaccine preparations and oral vaccination efficacy. Journal of Shimonoseki University of Fisheries. 40. 139-144
- Itami, T. ; Kondo, M. ; Uozu, M. ; Suganuma, A. ; Abe, T. ; Nakagawa, A. ; Suzuki, N. ; Takahashi, Y. (1996 a) : Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida*

- infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Journal of Fish Diseases. 19. 185-187
- Itami, T. ; Takahashi, Y. ; Nakamura, Y. (1989) : Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Journal of Aquatic Animal Health. 1. 238-242
- Itami, T. ; Takahashi, Y. ; Yoneoka, K. ; Yan, Y. (1991) : Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet. Journal of Aquatic Animal Health. 3. 151-152
- Itami, T. (1996 b) : Vaccination and immunostimulation in shrimps. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps. 14-17 may 1996. Sarabia Manor Hotel, Iloilo, Philippines. pp. 50. SEAFDEC.
- Johnson, S.K. (1978) : Handbook of shrimp diseases. Texas A&M University. Sea Grant College Program.
- Kado, C.I. ; Liu, S.-T. (1981) : Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology. 145. 1365-1373
- Kaneko, T. ; Colwell, R.R. (1973) : Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. Journal of Bacteriology. 113. 24-32
- Kaneko, T. ; Colwell, R.R. (1975) : Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and Copepods. Applied Microbiology. 29. 269-274
- Kaneko, T. ; Colwell, R.R. (1978) : The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. Microbial Ecology. 4. 135-155
- Kirpichnikov, V.S. ; Ilyasov, J.I. ; Shart, L.A. ; Vikhman, A.A. ; Ganchenko, M.V. ; Ostashovsky, A.L. ; Simonov, V.M. ; Tikhonov, G.F. ; Tjurin, V.V. (1993) : Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio*) for resistance to dropsy : principal results and prospects. Aquaculture. 111. 7-20
- Kodama H, Moustafa M, Ishiguro S, Miakami T, Izawa H. 1984. Extracellular virulence factors of fish *Vibrio* : relationship between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. Am. J. Vet. Res. 45: 2203-2207
- Köster, W.L. ; Actis, L.A. ; Waldbeser, L.S. ; Tolmasky, M.E. ; Crosa, J.H. (1991) : Molecular characterization of the iron transport system mediated by the pJM1 plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. Journal of Biological Chemistry. 266. 23829-23883
- Kothary, M.H. ; Kreger, A.S. (1985) : Purification and characterization of an extracellular cytotoxin produced by *Vibrio damsela*. Infection and Immunity. 49. 25-31

- Kreger A, Lockwood D (1981) Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immunol* 33: 583-590
- Kreger, A.S. (1984) : Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity*. 44. 326-331
- Krovacek, K. ; Faris, A. ; Anhe, W. ; Månsson, I. (1987) : Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucus-coated glass slides. *FEMS Microbiology Letters*. 42. 85-89
- Kühn, I. ; Austin, B. ; Austin, D.A. ; Blanch, A.R. ; Grimont, P.A.D. ; Jofre, J. ; Koblavi, S. ; Larsen, J.L. ; Mollby, R. ; Pedersen, K. ; Tiainen, T. ; Verdonck, L. ; Swings, J. (1996) : Diversity of *Vibrio anguillarum* isolates from different geographical and biological habitats, determined by the use of combination of eight different typing methods. *Syst. Appl. Microbiol.* 19. 442-450
- Larsen, J.L. ; Pedersen, K. ; Dalsgaard, I. (1994) : *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *J. Fish Dis.* 17 : 259-267
- Le Balle, V. (1989) : La Station d'Aquaculture de Saint-Vincent (SASV) et la culture des Pénéides en Nouvelle-Calédonie. Travaux sur l'acclimatation des postlarves. Stage DESS Exploitation des ressources vivantes côtières, Université de Caen.
- Le Groumellec, M. ; Goarant, C. ; Haffner, P. ; Mermoud, I. and 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. Poster présenté au congrès annuel de la World Aquaculture Society, 29 janvier au 2 février 1996, Bangkok.
- Le Groumellec, M. ; Martin, C. ; Haffner, P. ; Martin, B. ; Aquacop (1995) : Cell culture from tropical shrimps. *J Aqua Trop* 10: 277-286
- Le Moullac, G. ; D. Saulnier ; J. Rodriguez ; E. Bachre ; M. Barracco ; J. Cuellar-Anjel and Jiravanichpaisal, P. 1998 : Establishment of health criteria in reared penaeid shrimp and analysis of immune parameters under stress conditions. Workshop " Shrimp immunity and disease control, INCO-DC, November 8-11, 1998, Chiang Mai, Thailand.)
- Le Moullac, G. ; Le Groumellec, M. ; Ansquer, D. ; Froissard, S. ; Lévy, P. ; Aquacop (1997) : Haematological and phenoloxydase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in

- relation with the moult cycle : protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 7: 227-234
- Lee, K.K. ; Chen, Y.L. ; Liu, P.C. (1999) : Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 25. 181-193
- Lee, K.K. ; Chen, F.R.; Yu, S.R. ; Yang, T.I. ; Liu, P.C. (1997b) : Effects of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* on penaeid prawn plasma components. *Letters in Applied Microbiology* 25: 98-100
- Lee, K.K. ; Yu, S.R. ; Liu, P.C. (1997a) : Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 34: 110-117
- Lee, K.K. ; Yu, S-R. ; Chen, F-R. ; Yang, T-I. ; Liu, P-C. (1996) Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology* 32: 229-231
- 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. 248-253
- Liao IC. 1992. Penaeid larviculture: Taiwanese method. *in* : Fast AW, Lester LJ, Marine shrimp culture: principles and practices. Volume 23, *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier: Amsterdam. Pp. 193-216
- Lightner, D.V. (1978) : Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsala*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32:139-150
- Lightner, D.V. (1988 a) : *Vibrio* disease of Penaeid shrimp. p. 42-47. *in* Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture *in* *Developments in aquaculture in fisheries science*, Vol. 17. (Ed. : Sindermann, C.J. and Lighthner, D.V.) Elsevier, Amsterdam.
- Lightner, D.V. (1988 b) : Bacterial shell (brown spot) disease. *in* *Developments in aquaculture and fisheries science*, vol. 17. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture.. C.J. Sindermann and D.V. Lightner, editors. Elsevier. pp.48-51
- Lightner, D.V. (1992) Shrimp virus diseases : Diagnosis, distribution and management. Pages 238-253 *in* *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.

- Lightner, D.V. (éditeur) (1996) : A hand book of shrimp pathology and diagnosis procedures for disease of cultured Penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.
- Lin, C.K. (1989) : Prawn culture in Taiwan. What went wrong ? World Aquaculture 20(2): 19
- Linder, K. ; Oliver, J.D. (1989) : Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*. Applied and Environmental Microbiology. 55. 2837-2842
- Liu PV (1957) Survey of hemolysin production among species of Pseudomonads. J Bacteriol 74: 718-727
- Liu, P.C. ; Lee, K.K. (1999) : Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology 28: 428-430
- Martinez, I. ; Espelid, S. ; Johansen, A. ; Welsh, J. ; McClelland, M. (1994) : Fast identification of species and strains of *Vibrio* by amplification of polymorphic DNA. J. Fish Diseases. 17:297-302
- 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
- Mohney, L.L. ; Lightner D.V. ; Bell T.A. (1994) : An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 25(1):116-125
- Moriarty, D.J.W. (1998) : Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164:351-358
- Muroga, K. ; Suzuki, K. ; Ishimaru, K. (1994) : Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. Journal of the World Aquaculture Society. 25. 50-54
- Nagasawa, S. (1987) : Exoskeletal scars caused by bacterial attachment to copepods. Journal of Plankton Research. 9. 749-753
- Newman, M.C. ; Feng, S.Y. (1982) : Susceptibility and resistance of the rock crab, *Cancer irroratus*, to natural and experimental bacterial infection. J Invert Pathol 40: 75-88

- Nishibuchi, M. ; Seidler, R.J. (1983) : Medium-dependent production of extracellular enterotoxins by non-O-1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. *Appl Environ Microbiol* 45: 228-231
- Nottage, A.S. ; Birkbeck, T.H. (1986) : Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain NCMB 1338 and other marine *Vibrio*. *Journal of Fish Diseases* 9: 249-256
- Nottage, A.S. ; Birkbeck, T.H. (1987) : The role of toxins in *Vibrio* infections of bivalve molluscs. *Aquaculture* 67: 244-246
- Olsen, J.E. ; Larsen, J.L. (1990) : Restriction fragment length polymorphism of the *Vibrio anguillarum* serovar O1 virulence plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 56:3130-3132
- Osorio, C.R. ; Romalde, J.T. ; Barja, J.L. ; Toranzo, A.E. (2000) : Presence of phospholipase-D (dly) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp *damsela*. *Microbial Pathogenesis* 28: 119-126
- Panouse, J.B. (1943) : Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. *C.R. Acad. Sci., Paris* 217:553-555
- Pedersen, K. (1997) : Viability during storage and stability of plasmids during storage and subculturing in strains of *Vibrio anguillarum*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 38. 315-322
- Pedersen, K. ; Larsen, J.L. (1995) : Evidence for the existence of distinct populations of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 based on plasmid contents and ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61. 2292-2296
- Pedersen, K. ; Dalsgaard, I. ; Larsen, J.L. (1997) : *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3711-3715
- Pelmont, J. (1993) : Bactéries et environnement ; adaptations physiologiques. Collection Grenoble Science, Presses Universitaires de Grenoble. 899 pp.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 32:1949-1957
- Ralph, D. ; Mc Clelland, M. ; Welsh, J. ; Baranton, G. ; Perolat P. (1993) : Pathogenic *Leptospira* categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* 175:973-981

- Ratcliffe, N.A. ; Rowley, A.F. (1979) : Role of hemocytes in defense against biological agents. Insect hemocytes-development forms, functions, and techniques, Cambridge univ. Press. 331-414
- Rodrigues, D.P. ; Ribeiro, R.V. ; Alves, R.M. ; Hofer, E. (1993) : Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 589-592
- Rosenberry, B. (éditeur) (1997) : World Shrimp Farming 1997; An annual report published by Shrimp News International
- Rosenberry, B. (éditeur) (1998) : World Shrimp Farming 1998; An annual report published by Shrimp News International
- Rosenberry, B. (éditeur) (2000) : World Shrimp Farming 1999; Number 12; Published annually; Shrimp News International
- Saeed, M.O. (1995) : Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. Aquaculture. 136. 21-29
- Sano, T. ; Fukuda, H. (1987) : Principal microbial diseases of mariculture in Japan. Aquaculture, 67: 59-69
- Sarkar, B.L. ; Balakrish Nair, G. ; Banerjee, A.K. ; Pal, S.C. (1985) : Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater environs and in association with freshwater fishes in Calcutta. Applied and Environmental Microbiology. 49. 132-136
- Sarkar, B.L. ; Balakrish Nair, G. ; Sircar, B.K. ; Pal, S.C. (1983) : Incidence and level of *Vibrio parahaemolyticus* associated with freshwater plankton. Applied and Environmental Microbiology. 46. 288-290
- 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. in. World Aquaculture Society. editor. Book of abstracts World Aquaculture Society annual conference (1999). 26 April - 2 May 1999. Sydney, Australia. World Aquaculture Society. pp. 678
- Saulnier, D. ; Avarre, J.-C. ; Le Moullac, G. ; Ansquer, D. ; Levy, P. ; Vonau, V. (2000) : Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. Diseases of Aquatic Organisms, 40: 109-115

- Sinderman, C.J. (1988) : Shell disease. *in* Developments in aquaculture and fisheries science, vol. 17. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture.. C.J. Sindermann and D.V. Lightner, editors. Elsevier. pp.194-196
- Skjermo, J. ; Defoort, T. ; Dehasque, M. ; Espevik, T. ; Olsen, Y. ; Skjak-Braek, G. ; Sorgeloos, P. ; Vadstein, O. (1995) : Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism *Artemia*. *Fish and shellfish immunology*. 5. 531-534
- Smith, M.A. ; Bidochka, M.J. (1998) : Bacterial fitness and plasmid loss : the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology*. 44. 351-355
- Smith LL, Biedenbach JM, Lawrence AL. (1992) : Penaeid larviculture: Galveston method. *in* : Fast AW, Lester LJ, Marine shrimp culture: principles and practices. Volume 23, Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier: Amsterdam. p 171-192
- Söderhäll, K. ; Häll, L. (1984) : Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta*. 797: 99-104
- Sovenyi, J.F. ; Bercsenyi, M. ; Bakos, J. (1988) : Comparative examination of susceptibility of two genotypes of Carp (*Cyprinus carpio*) to infection with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*. 70. 301-308
- Sung, H.H. ; Song, Y.L.(1996) : Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 145. 41-54
- Teunissen, O.S.P. ; Faber, R. ; Booms, G.H.R. ; Latscha, T. (1998) : Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 164. 359-366
- Toranzo, A.E. ; Barja, J.L. ; Colwell, R.R. ; Hetrick, F.M. ; Crosa, J.H. (1983) : Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic Coast. *FEMS Microbiol Lett* 18:257-262
- Tsai, M.F. ; Kou, G.H. ; Liu, H.C. ; Liu, K.F. ; Chang, C.F. ; Peng, S.E. ; Hsu, H.C. ; Wang, C.H. ; Lo, C.F. (1999) : Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks *Diseases of Aquatic Organisms*. 38: 107-114
- Umbreit, T.H. ; Tripp, M.R. (1975) : Characterization of the factors responsible for death of fish infected with *Vibrio anguillarum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 21. 1272-1274

- Valla, S. ; Frydenlund, K. ; Coucheron, D. , Haugan, K. ; Johansen, B. ; Jorgensen, T. ; Knudsen, G. ; Strom, A.R. (1992) : Development of a gene transfer system for curing of plasmids in the marine fish pathogen *Vibrio salmonicida*. Applied and Environmental Microbiology 58:1980-1985
- Venkateswaran, K. ; Kim, S.W. ; Nakano, H. ; Onbé, T. ; Hashimoto, H. (1989) : The association of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes with zooplankton and its relationship with bacterial indicators of pollution. Syst. Appl. Microbiol. 11. 194-201
- Versalovic, J. ; Woods, C.R. ; Georghiou, P.R. ; Hamill, R.J. ; Lupski, J.R. (1993) : DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. Arch. Pathol. Lab. Med. 117: 1088-1098
- Welsh, J. ; McClelland, M. (1990) : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218
- Welsh, J. ; Pretzman, C. ; Postic, D. ; Saint Girons, I ; Baranton, G. ; McClelland, M. (1992) : Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* in three distinct phyletic groups. Int. Syst. Bacteriol. 42: 370-377
- Weppe, M. ; Bonami, J. R. ; Lightner, D.V. y AQUACOP (1992) : Demostración de la altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. in Memorias I Congreso Ecuatoriano de acuicultura, Ed. : Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1993 pp. 229-232
- Wiik, R. ; Andersen, K. ; Daae, F.L. ; Hoff, K.A. (1989) : Virulence studies based on plasmid profiles of the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. Applied and Environmental Microbiology. 55. 819-825
- Williams, J.G.K. ; Kubelik, A.R. ; Livak, K.J. ; Rafalski, J.A. ; Tingey S.V. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535

Annexes techniques

Bactériologie, Milieux

1 - ZoBell ou **Marine Agar** (Broth) : milieu de culture de la flore marine hétérotrophe totale.

- 4 g de peptone
- 1 g d'extrait de levure
- 1 l d'eau de mer artificielle (Instant Ocean, Aquarium System), à 25‰
ou 750 ml d'eau de mer stérile+ 250 ml Eau distillée.
(+ 15 g Agar pour la gélose)
- Ajuster, à froid, le pH à 7,6-7,8 (à chaud environ 7,2-7,4)
- Autoclaver à 121°C, 1 bar, 20 min

Le milieu de ZoBell est commercialisé : Marine Agar 2216 E (Difco), qui est réhydraté à l'eau distillée. Il n'est normalement pas nécessaire de réajuster le pH.

2 - Eau peptonée : milieu d'enrichissement.

L'eau peptonée est préparée avec de l'eau de mer stérile ramenée à 20-25 ‰ de salinité, en additionnant 15 g / litre de peptone.

3 – TSB / TSA salé 2 % : cultures de masse, repiquages

Milieu TSA commercial réhydraté avec de l'eau additionnée de 1,5 à 2 % NaCl (w/v),

- * ou avec de l'eau de mer artificielle (Instant Ocean) à 15 - 20 ‰
- * ou avec de l'eau de mer stérile ramenée à 15 - 20 ‰

4- TCBS (Difco) : Milieu sélectif des *Vibrionaceae*.

- 10 g de peptone
 - 5 g d'extrait de levure
 - 10 g de citrate de sodium
 - 10 g de thiosulfate de sodium
 - 10 g de chlorure de sodium
 - 8 g de bile de bœuf
 - 1 g de citrate ferrique
 - 20 g de saccharose
 - 0,04 g de bleu de bromothymol
 - 0,04 g de bleu de thymol
 - 14 g d'agar.
- porter à ébullition, ne pas autoclaver.

Bactériologie, Chitine

D'après Hansen et Sorheim, 1991

Dissoudre des carapaces broyées dans HCl pur (1 heure).
Précipiter la chitine à l'éthanol 95°.
Récupérer la chitine précipitée par centrifugation.
Rincer au moins 5 fois à l'eau distillée.
Ajuster le pH à 7-7,5.
Autoclaver : on obtient ainsi une solution colloïdale stock.

Extraction d'ADN

1 – Technique au Chelex 100

Solutions stocks

Solution de Chelex à 5%:

Chelex 100 TM (Sigma)	5 g
H ₂ O mQ	qsp 100ml (+agitateur magnétique)
Autoclaver et conserver à 4°C	

Protéinase K:

TrisHCl pH 8,0	100 mM (12,1 g/l)
protéinase K	500 µg/ml

Protocole

*Déposer 400 µl de solution de Chelex à 5%, sous agitation magnétique, dans un tube Eppendorf stérile;

*Verser 40 µl de solution de protéinase K;

*Ajouter ensuite 10 µl d'hémolymphe à tester en solution d'Alsever

*Vortexer brièvement le tout;

*Mettre à incuber 4 à 5 heures dans un bain à sec à 56°C;

*Incuber ensuite 15 minutes à 100°C;

*Vortexer brièvement;

*Mettre immédiatement sur glace;

*Centrifuger brièvement (condensation au niveau du bouchon)

*Pour l'amplification génique, prendre soin de faire décongeler sur glace.

2 - Technique au phénol-chloroforme

D'après Brenner *et al.*, 1982

Cinquante millilitres de culture sont centrifugés 10 minutes à 10 000 g. Le culot est entièrement remis en suspension dans du tampon de lyse et incubé une heure à 56°C.

Tampon de lyse :

NaCl	100 mM
Tris HCl	10 mM
EDTA	25 mM
SDS	1%
Protéinase K	1 µg / ml
pH 8,0	

Les acides nucléiques sont ensuite extraits par un mélange phénol – chloroforme – alcool isoamylique (25:24:1, vol/vol/vol) sous hotte. Après 5 minutes de centrifugation à 10 000 g, la phase supérieure (qui contient les acides nucléiques) est récupérée dans un nouveau récipient. Après ajout d'acétate de Sodium (3 M ; pH 5,2) les acides nucléiques sont précipités par de l'éthanol absolu, et culotés par centrifugation de 10 minutes à 10 000 g (afin d'améliorer le

rendement d'extraction, les tubes d'extraction peuvent être placés à -20°C , ce qui favorise la précipitation des acides nucléiques). Le culot d'acides nucléiques est rincé 3 fois à l'éthanol 70%, séché puis resuspendu dans du tampon d'élution Tris EDTA + $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de RNase A.

3 – Technique à la silice

D'après Boom *et al.*, 1990

DNAs were extracted and purified according two different methods. (ii) DNAs were also extracted using silica particles and guanidium isothiocyanate lysis buffer according to the 2 hour method described by Boom *et al.* (4) on small culture aliquots (3 to 5 ml).

AP-PCR

1 – Amorces testées

KF (5'-CACACGCACACGGAAGAA-3'),
KN (5'-CCTTGCGCGC ATGTACATGG-3'),
RSP (5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'),
KZ (5'-CCCATGTGTACGCGTGTGGG-3'),
KpnR (5'-CCAAGTCGACATGGCACRTGTATACATAYGTAAC-3'),
KG (5'-CACACGCACACGGAAGAA-3'),
SP (5'-TTGTAAAACGACGGCCAG-3')

Fournies par Genset, Paris, France.

2 – Mélange réactionnel

ADN de la souche étudiée	100 ng
MgCl ₂	4 mM
dNTP	0,2 mM chacun
[³² P]dCTP*	5 µCi (3 000 Ci / mmol, Amersham International)
Amorce	1 µM
<i>Taq</i> polymérase (Amersham)	1,25 U
Tampon <i>Taq</i> Polymerase 1X	qsp 50µl

Tampon *Taq* Polymerase 1X :

Tris HCl, pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM

3 - Profil thermique de l'amplification

Deux premiers cycles de faible stringence :

Dénaturation	94 °C pendant 5 minutes
Appariement (annealing)	40 °C pendant 5 minutes
Élongation	72 °C pendant 5 minutes

Puis quarante cycles :

Dénaturation	94 °C pendant 1 minutes
Appariement (annealing)	60 °C pendant 1 minutes
Élongation	72 °C pendant 2 minutes

PCR *V. penaeicida*

D'après Saulnier *et al.*, 2000

1 – Amorces

sens **VpF** (5'-GTGTGAAGTTAATAGCTTCATATC-3'),
antisens **VR** (5'-CGCATCTGAGTGTCAGTATCT-3'),

Fournies par Genset, Paris, France.

2 – Mélange réactionnel

Extrait ADN à étudier	10 µl
Prémix Vp	10 µl
<i>Taq</i> polymerase	0,5 U

Prémix Vp :

Tris HCl, pH 9,0	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	2,5 mM
Triton X 100	0,1 %
dNTP	0,2 mM chacun

3 - Profil thermique de l'amplification

Dénaturation initiale : 94 °C pendant 5 minutes

Trente cinq cycles :

Dénaturation	94 °C pendant 1 minutes
Appariement (annealing)	58 °C pendant 1 minutes
Élongation	72 °C pendant 1 minutes

Élongation finale : 72 °C pendant 5 minutes

Formules rostrales chez L. stylirostris, et stade postlarvaire correspondant.

D'après Le Balle, V. (1989) Rapport de stage à la SASV.

Formule rostrale	Stade(s) typique(s) (atypique)	Valeur Pln utilisée pour les calculs
1/0	PL 1	1
2/0	PL 2 et PL 3	2,5
3/0	PL 4	4,5
4/0 ou 4/1	PL 6	6
5/0 ou 5/1	PL 7	7
5/2	(PL 7)	7
6/0	(PL 7 et PL 8)	8
6/1 ou 6/2	PL 8	8
7/2	(PL 8)	9
7/2 ou 7/3	PL 9	9
7/4	(PL 9 ou définitive)	9,5
8/3	définitive	10
8/4	(définitive)	10
9/3 ou 9/4	(définitive)	10

Certaines autres formules rostrales peuvent être observées, correspondant à des cas atypiques moins fréquents.

Comptages hématocytaires

L'hémolymphe est ponctionnée dans le sinus ventral à l'aide d'une seringue de 1 millilitre montée d'une aiguille 25 G 16 mm 5/10. L'hémolymphe est ensuite déposée à l'aide de la seringue, aiguille enlevée, sur une languette de Parafilm®. Vingt cinq microlitres d'hémolymphe sont repris à la micropipette et mélangés à 75 microlitres de solution d'Alsever additionnée de 15% de formol. Ce prélèvement est conservé à 4°C jusqu'au comptage.

Solution d'Alsever :

trisodium citrate	30 mM	8,82 g / litre
NaCl	338 mM	19,75 g / litre
glucose	115 mM	20,72 g / litre
EDTA	10 mM	2,92 g / litre
pH 7,0		

Le comptage des hématocytes totaux (THC) est réalisé dans une cellule de Malassez à l'aide d'un microscope Leica DMLB à l'aide du grossissement X400 en contraste de phase.

Explants primaires de cellules de crevettes

D'après Le Groumellec *et al.*, 1995

Les crevettes sont brièvement anesthésiées par le froid dans de l'eau froide à 4°C pendant environ 30 minutes.

Elles sont alors plongées pendant quelques secondes dans une solution à 10 % d'hypochlorite de sodium, puis dans un bain à 7 % de teinture d'iode (Argentyne®, Laboratoire Argent).

L'hémolymph est ponctionnée dans le sinus ventral à l'aide d'une seringue de 1 millilitre montée d'une aiguille 25 G 16 mm 5/10 stériles. Plusieurs étapes de centrifugation douce suivie de rinçages à l'aide d'une solution de Leibovitz permettent de récolter les **hémocytes**.

L'ovaire (au stade de maturation I à II) est disséqué sous loupe binoculaire dans une hotte à flux laminaire, la crevette étant immergée dans une solution de Leibovitz. L'ovaire est broyé au potter. Les fragments sont rincés à l'aide d'une solution de Leibovitz. Une phase de trypsinisation (0,1 % à 37°C pendant 20 minutes) sous agitation permet de séparer les **ovocytes** des agrégats cellulaires.

Les cellules ainsi récoltées (hémocytes, ovocytes) sont mis en culture dans un à deux millilitres de milieu de maintenance (1xM 199 (Sigma) complétementé avec 1 % de solution antibiotique – antimycotique (Sigma) et 10 % de sérum de veau fétal (Sigma)).

Les milieux en poudre sont réhydratés avec une solution à 0,1 M NaCl (Sigma) et 0,01 Tris HCl, pH 8,0.

Appendice : Bases biologiques et historique de l'aquaculture de crevettes

1. Biologie des crevettes Pénéides en milieu naturel

1.1 Morphologie et anatomie

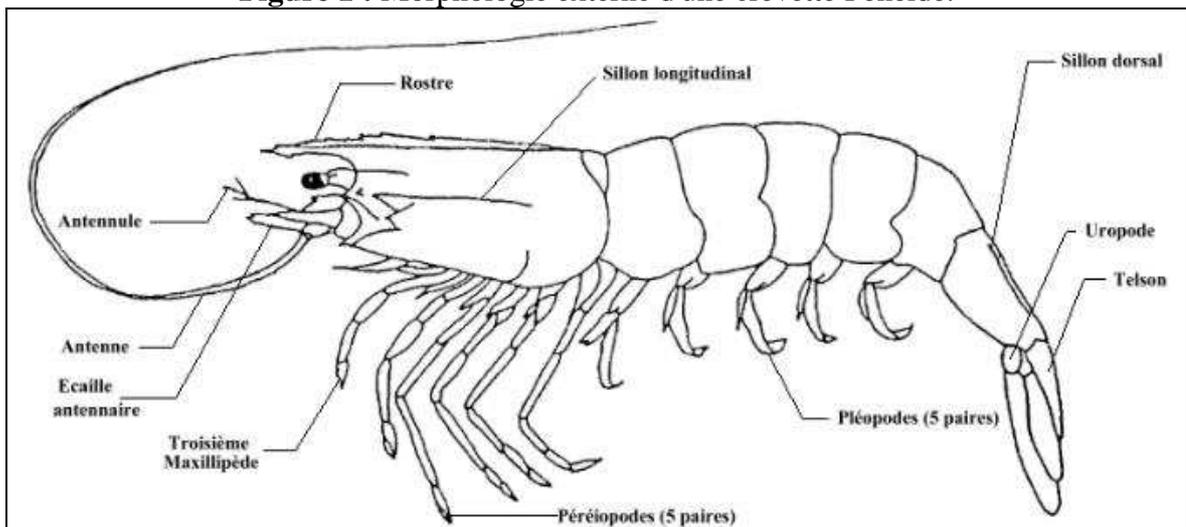
Ces éléments sont extraits de l'ouvrage "Traité de zoologie ; Anatomie, systématique, biologie. Crustacés. Tome VII, Fascicule I" publié chez Masson sous la direction de (Grassé 1994).

La morphologie externe des crevettes Pénéides est caractéristique d'un Crustacé Décapode. Le corps est subdivisé en deux parties, la plus antérieure correspondant à la fusion de la tête et du thorax a logiquement pris le nom de "céphalothorax", la partie postérieure correspondant à l'abdomen.

Le céphalothorax correspond à la fusion de métamères, et ne présente plus de segmentations extérieurement décelable. Il porte cinq paires de pattes marcheuses ou "péréiopodes", une paire d'antennes, une paire d'antennules, une paire d'écailles antennaires, ainsi que trois paires d'appendices destinés à la prise de nourriture et à la mastication (mandibules, maxillules et maxilles).

L'abdomen est segmenté et porte une paire d'appendices par segment. Les cinq paires antérieures correspondent à des pattes nageuses ou "pléopodes", la dernière paire ("uropodes") formant avec le telson ou "pygidium" une véritable nageoire caudale.

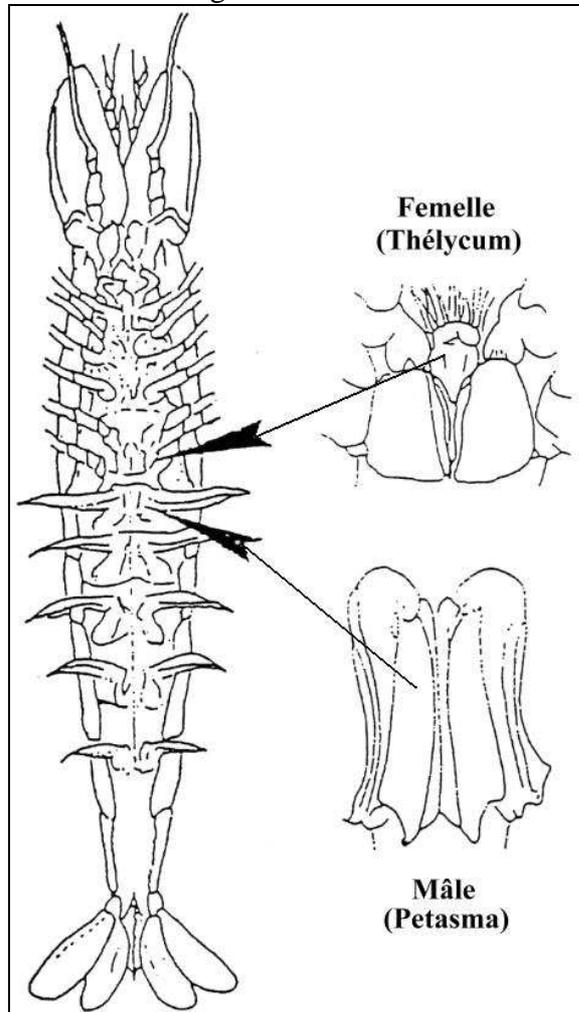
Figure 1 : Morphologie externe d'une crevette Pénéide.



La face ventrale présente un dimorphisme sexuel : chez la femelle, un réceptacle séminal, situé à la face ventrale du dernier segment thoracique, destiné à recevoir les spermatophores du mâle,

porte le nom de **thélycum**. Chez les mâles, un organe copulateur résultant de la fusion des endopodites de la première paire de pléopodes dans un plan sagittal a reçu le nom de **petasma**.

Figure 2 : Dimorphisme sexuel et organes sexuels externes chez les crevettes Pénéides.

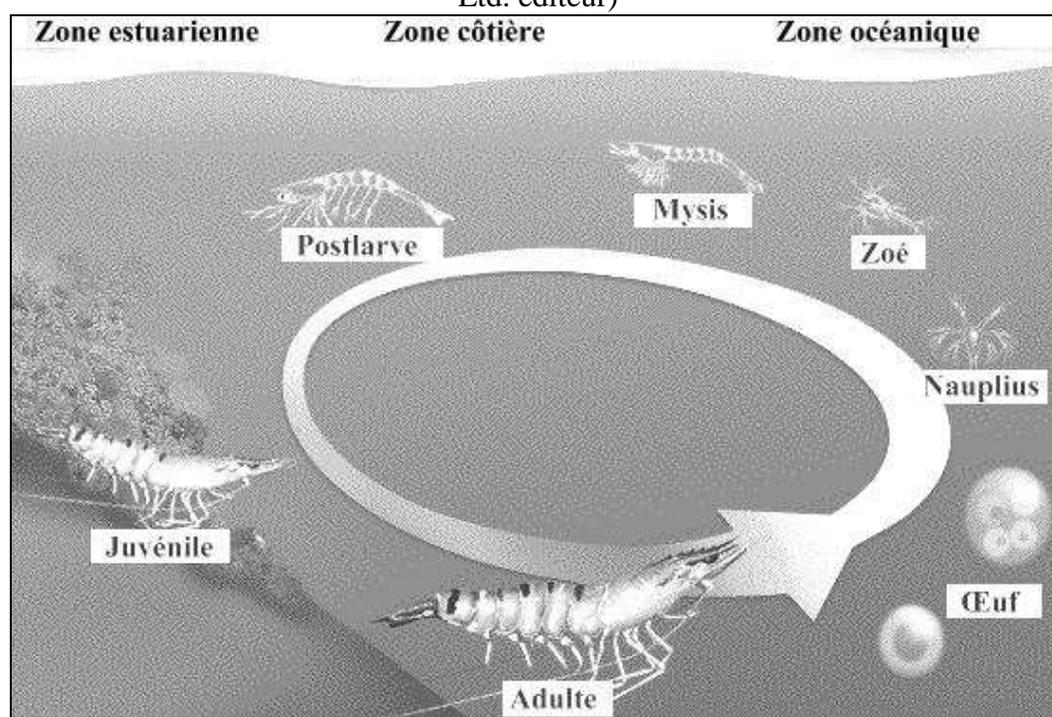


1.2 Cycle biologique en milieu naturel

Dans le milieu naturel, les adultes (individus sexuellement matures) se rassemblent de façon saisonnière en zone côtière pour la ponte. Lors de la copulation, les mâles déposent sur le thélycum des femelles matures leur spermatophores. Les ovocytes sont fécondés au moment de la ponte. Par le jeu des courants, les œufs sont entraînés en zone océanique, où se déroule l'éclosion. Les premiers stades larvaires (5 à 6) correspondent à des stades "Nauplius", qui nagent activement vers la surface, guidés par un phototropisme positif. Les stades Nauplius ne s'alimentent pas, mais survivent sur les réserves vitellines de l'œuf. La première métamorphose conduit aux stades Zoé (3 stades) qui se nourrissent activement d'algues unicellulaires. Les stades Mysis (au nombre de 3), zoophagiques succèdent aux Zoé. Enfin, les mysis se

métamorphosent en postlarves, à comportement benthique, assez semblables aux juvéniles sur le plan de la morphologie. Les mues postlarvaires successives se traduisent principalement par, outre l'augmentation de taille, la mise en place de l'ornementation de l'exosquelette. Au niveau du rostre, la mise en place des "dents" permet au cours de ces stades postlarvaires de connaître le stade de développement.

Figure 3 : Cycle biologique des crevettes Pénéides en milieu naturel.
(illustration d'après (Alday de Graindorge and Flegel 1999) : Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) CD-rom, FAO et Multimedia Asia Co., Ltd. éditeur)



2. Le cycle biologique en captivité et les systèmes de production.

Bien que le recours aux populations sauvages à différents stades de développements soit encore très fréquent, l'ensemble du cycle biologique en captivité des espèces élevées est maîtrisé.

2.1. Le cycle biologique en captivité

La maîtrise du cycle biologique complet n'est que rarement indispensable à la mise en place d'une aquaculture de crevettes. Les premiers élevages de crevettes ont été réalisés " involontairement " il y a plusieurs siècles dans des bassins situés en zone de marnage, et dont les digues étaient ouvertes saisonnièrement pour laisser entrer des larves et juvéniles de certaines espèces de poissons. La pénéculture moderne qui pratique en très grande majorité des

élevages monospécifiques exploite encore cette abondance saisonnière de postlarves de crevettes, nous le verrons plus loin. Seuls quelques pays producteurs de crevettes ont mis en place des systèmes permettant de réaliser l'ensemble du cycle biologique en captivité.

2.1.1. L'obtention de pontes fécondées

La première difficulté est l'obtention de pontes fécondées à partir de géniteurs, qu'ils soient élevés en captivité ou issus de la pêcherie. Les mâles sont généralement directement exploitables. La maturation des ovaires chez les femelles peut être spontanée en bassins, ou obtenue dans des enceintes d'élevages chauffées (" zone de maturation "), dans lesquelles un apport de nourriture fraîche important favorise le maturation sexuelle. L'ablation d'un des pédoncules oculaires permet l'ablation simultanée d'un des organes Y (glandes sécrétrices paires situées dans le pédoncule oculaire), induisant une baisse de la concentration de l'hormone inhibant le développement des ovaires. La maturation ovarienne est donc stimulée par ce mécanisme (Panouse 1943) ; (Adiyodi and Adiyodi 1970) ; (CNEXO Aquaculture Team 1974)). Une observation attentive du développement des ovaires par transparence permet de repérer les femelles prêtes à pondre. La fécondation des femelles peut être naturelle lorsque des animaux des deux sexes sont mélangés dans le même bac de maturation. Cette fécondation naturelle est même obligatoire pour les espèces à thélycum dit " fermé " (*P. monodon* par exemple), car elle doit avoir lieu à un moment précis du processus de mue. Chez les espèces à thélycum " ouvert " (dont *Litopenaeus stylirostris*), un système d'insémination artificielle a été développé. Les spermatophores de mâles choisis sont extraits par simple pression latérale. La paroi chitineuse est ôtée, le sperme est déposé sur le thélycum de la femelle mature. Les femelles sont isolées dans des bacs individuels, " pondoirs " dans lesquelles elles émettent leurs œufs, fécondés au moment de la ponte. En fonction de l'espèce, de la condition physiologique, de la température..., chaque femelle peut fournir 50 000 à 1 million d' œufs, dont une partie donnera des larves Nauplius viables.

En milieu naturel, la ponte des crevettes Pénéides est nocturne. Des systèmes d'éclairage simulant une inversion de la photopériode sont installés dans les salles de maturation et de ponte permettant, pour plus de facilité de travail, d'obtenir des pontes en cours de journée.

2.1.2. L'éclosion et l'élevage larvaire

Après la ponte, la femelle est retirée du pondoir, où se déroule l'éclosion, dix-huit heures après la ponte environ. La vidange des pondoirs permet de récolter les premiers stades larvaires au stade nauplius, mais également les restes des œufs après éclosion, les œufs non éclos, et les éventuels fécès de la femelle. Cette récolte est rincée et transférée dans les bacs d'élevage larvaire. Dans certains systèmes (notamment celui mis au point par l'IFREMER, cette récolte est placée dans des "éclosoirs" où les seules larves viables et présentant une vitalité suffisante sont récoltées par phototropisme. Ce système présente le double avantage de l'élimination de nombreux déchets potentiellement contaminés (et contaminants) et d'un rinçage particulièrement efficace des larves avant ensemencement des bacs d'élevage larvaire. Celui-ci se déroule dans des bacs de volume généralement important (de 2 à plus de 500 mètres cubes), généralement chauffés à 28-30°C, à partir de nauplii de même jour d'éclosion.

Une typologie des écloséries est proposée par (Fast and Lester 1992), reposant sur l'origine historique et géographique des systèmes, reflétant leur capacité de production et leur mode de gestion. Cette typologie est extrêmement schématique et de nombreux types intermédiaires ont été développés dans divers pays. Toutefois, cette typologie demeure intéressante :

Les **écloséries type Galveston**, industrielles et souvent de grande taille, présentent une grande technicité et reposent sur un savoir-faire beaucoup plus important (Smith; Biedenbach, and Lawrence 1992). Elles utilisent la technique d'élevage en eau claire mise au point par les chercheurs du laboratoire de Galveston (au Texas). Elles utilisent des densités d'ensemencement généralement élevées (100 à 150 nauplii par litre), dans des bacs de faible volumes (quelques mètres cubes) et une adduction d'eau filtrée, chauffée et contrôlée. Les algues unicellulaires nécessaires aux stades zoé phytophages sont produites dans des laboratoires séparés et leur concentration est ajustée quotidiennement par des apports de culture pure. Le premier changement d'eau intervient dès la fin des stades Zoé, où 50% de l'eau est renouvelée quotidiennement. Ces écloséries utilisent de grandes quantité de nauplii d'*Artemia* sp. comme proies vivantes pour les stades mysis et postlarvaires zoophages. Les survies de ces écloséries sont généralement régulières, de l'ordre de 70 à 80 % en dehors d'accident pathologique.

Ces écloséries de grande taille supportent la forte variabilité des demandes en postlarves dues à la variabilité des pêches de postlarves sauvages. En Amérique Latine où elles sont le plus fréquentes, elles sont souvent cogérées par plusieurs grandes fermes de grossissement, financées par de grands groupes économiques et jouent un rôle moteur dans les programmes récents de production de souches domestiquées et de sélection génétique.

Les **écloseries de type Taiwanais** (Liao 1992), travaillent en “eaux vertes” dans des bacs extérieurs, selon une technique dérivée de travaux japonais (on parle aussi de “système japonais”). Elles sont fréquemment rencontrées en Asie du Sud-Est et ont fait les beaux jours de la crevetticulture Taiwanaise. Ce système tente d'établir un écosystème d'élevage proche des conditions naturelles de développement larvaire des Pénéides en milieu naturel. Des densités en nauplii faibles (10 à 80 par litre) sontensemencées dans des bacs de grande taille. Le développement d'un bloom de Diatomées est recherché et encouragé par l'ajout d'engrais. Le premier changement d'eau a lieu à la métamorphose des larves en postlarves. Les survies de ce type d'écloseries sont relativement constantes, et de l'ordre de 50% en dehors d'accident pathologique.

Les **petites écloseries asiatiques**, familiales ou regroupant un petit nombre de fermes de grossissement réalisent une production “en eaux vertes” (Forbes 1992). Elles ont vu le jour lorsque le déclin de la crevetticulture Taiwanaise (dans les années 1987-1988) a entraîné un exil massif des techniciens d'écloseries vers les pays voisins (Thaïlande, Philippines, Indonésie et Malaisie notamment). Les techniques sont initialement celles du système Taiwanais, mais de nombreuses variantes existent, dont des éléments apportés du système Galveston. Ces écloseries travaillent généralement à basse densité dans des bacs de petit volume (moins de 5 mètres cube). Elles se caractérisent par une spécialisation importante, et il existe ainsi des vendeurs de nauplii, de jeunes postlarves PL2 à PL5, de postlarves acclimatées PL12 à PL35, mais aussi des structures spécialisées dans la culture de Diatomées (*Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp. ...). Leur fonctionnement est fréquemment utilisé pour compenser un approvisionnement en postlarves d'autres origines insuffisant ou d'un prix trop élevé. La réussite des élevages larvaires y est assez aléatoire, dépendant beaucoup de la technicité du responsable, et des survies extrêmes de 0 à plus de 80% sont fréquentes. Leur petite taille leur permet une désinfection rapide avant un nouveau cycle d'élevage.

Dans tous les cas, les postlarves produites peuvent êtreensemencées directement en bassins de prégrossissement, en bassin de grossissement, ou subir une acclimatation aux conditions environnementales dans des bacs d'acclimatation ou "nurseries".

2.1.3. L'élevage des géniteurs

L'élevage des géniteurs de crevettes Pénéides est généralement différent du grossissement à but commercial, même si certaines écloséries ont parfois recours à des géniteurs issus de bassins de grossissement. Il a pour but d'obtenir des animaux de taille suffisante lors de la maturité sexuelle. Ces élevages reposent sur un principe de confort physiologique maximal pour l'animal, ils se réalisent de façon beaucoup plus extensive, afin d'assurer aux crevettes un confort physiologique et une croissance optimales. La nourriture distribuée est de grande qualité nutritionnelle, les teneurs en oxygène dissous toujours à des valeurs suffisantes grâce aux faibles densités d'élevage. Ces élevages permettent de disposer en 6 à 10 mois de géniteurs de taille comparable à celle des géniteurs sauvages.

Des techniques d'élevage de géniteurs en conditions intensives ont été développées, souvent pour répondre à des soucis d'économie de surface dans le cadre de nombreux lots d'animaux de faibles effectifs. C'est le cas notamment dans le cadre de programmes de sélection génétique qui doivent entretenir un nombre important de souches, lignées ou familles. L'IFREMER-COP à Tahiti a développé une technique de ce type, qui permet d'obtenir en 10 à 12 mois des géniteurs exploitables. Ces techniques sont souvent plus sophistiquées, reposent sur une oxygénation artificielle de l'eau et un contrôle rigoureux des paramètres physico-chimiques des enceintes d'élevages.

2.2. L'approvisionnement en postlarves

La pénéculture mondiale repose encore largement, on l'a vu, sur les stocks sauvages pour la fourniture des postlarves nécessaires à l'ensemencement des bassins de grossissement. Plusieurs stratégies se distinguent toutefois dans cette dépendance vis à vis des stocks sauvages. Dans de nombreux cas, les fermes de grossissement utilisent des postlarves capturées lors de leur arrivée en zone estuarienne. Ces postlarves sont transférées dans des structures de nursery jusqu'à un âge plus avancé, ou directementensemencées en bassins de grossissement. Dans d'autres cas, notamment lorsque les captures de postlarves sauvages sont insuffisantes, des postlarves sont produites en éclosérie à partir de géniteurs sauvages. Les lignées élevées sur plusieurs générations en captivité et connaissant un début de domestication sont particulièrement rares. Toutefois, la mise en place de programmes de sélection génétique sur les crevettes Pénéides ne peut se concevoir qu'à la condition de disposer de souches captives. De même, la dissémination de virus pathogènes dans les stocks sauvages rend particulièrement aléatoire la rentabilité des élevages ayant recours à ces stocks sauvages. La domestication et l'élevage contrôlé de lignées dont le statut sanitaire, les performances zootechniques et les

améliorations génétiques sont bien connus constituent désormais des atouts pour les régions productrices qui en disposent, et probablement un enjeu majeur pour la prochaine décennie.

2.3. Les systèmes de grossissement

Au niveau de la phase de grossissement, une très forte différenciation existe entre les systèmes. Leur dénomination s'appuie généralement sur le degré d'intensification des élevages, qui permettent de distinguer les systèmes suivants rappelés par Rosenberry (1997) :

Le **système extensif** est pratiqué principalement en Asie du Sud-Est (Inde, Vietnam, Bangladesh, Philippines, Indonésie) mais représente également une partie des surfaces de production de pays d'Amérique Latine (Équateur notamment). Il s'appuie largement sur la productivité naturelle, et correspond parfois à des élevages intégrés (volailles ou cochons + crevettes et / ou poissons). Ce type d'élevage, généralement familial, produit des rendements de quelques dizaines à quelques centaines de kg par hectare et par an ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$), à partir de densités d'ensemencement proches d'une postlarve par mètre carré. Les bassins utilisés pour ce type d'élevage sont de tailles très variables (de quelques à plusieurs centaines d'hectares), et sont caractérisés par un aménagement s'appuyant sur des circulations d'eau naturelles. Les renouvellements d'eau (environ 5% quotidiens) sont assurés par ces mouvements naturels, généralement les marées. Aucun apport d'aliment industriel n'est effectué pendant l'élevage. La production naturelle qui assure la croissance des animaux est souvent stimulée par une fertilisation organique ou minérale. Les coûts de production sont évalués entre 1 et 3 US\$ par kg de crevettes produites. Peu de nouvelles exploitations de ce type sont construites, notamment du fait du soucis croissant d'interdire l'utilisation des zones de mangrove et de marnage pour la pénéculture.

Le **système semi-intensif**, qui caractérise la plupart de la production d'Amérique Latine permet de produire environ 500 à 5000 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$, à partir de densités d'ensemencement de l'ordre de 5 à 20 voire 30 postlarves par mètre carré. Ce système se caractérise en particulier par la capacité du système d'élevage de disposer de suffisamment d'oxygène sans apport mécanique. Il est pratiqué dans des enceintes d'élevages de grande taille, généralement de l'ordre de 8 à 20 hectares, avec des extrêmes de l'ordre de 2 et 30 hectares. Ces bassins, situés au-dessus des zones de marnage, sont alimentés en eau par des pompes, assurant des renouvellements quotidiens de 1 à 30 %. L'alimentation naturelle est très largement complétée par des aliments industriels. Ce type d'élevage peut également se pratiquer en deux phases : les postlarves sont

d'abord placées dans des enceintes de prégrossissement à des densités élevées ; entre 1 et 3 grammes de poids moyen, elles sont réparties dans les enceintes de grossissement. Les coûts de production sont évalués entre 2 et 6 US\$ par kg de crevettes produites.

Le **système intensif** repose quant à lui sur un apport mécanique d'oxygène aux bassins, qui sont généralement de petite taille (inférieure à 5 hectares). Il utilise des densités d'ensemencement élevées (supérieures à 30 par mètre carré). Les renouvellements d'eau sont classiquement importants (supérieurs à 30% par jour) avec des tendances actuelles tendant à les limiter ou à rechercher des systèmes de recirculation. La croissance des crevettes repose en grande majorité sur un apport important d'aliment industriel. Les rendements escomptés sont de 5 000 à 20 000 kg.ha⁻¹.an⁻¹. Les coûts de production sont évalués entre 4 et 8 US\$ par kg de crevettes produites.

Diverses entreprises utilisant des **systèmes "super-intensifs"** existent à travers le monde (Thaïlande, États-Unis, Belize). Leurs objectifs de production de 20 à 100 tonne.ha⁻¹.an⁻¹ est rarement atteint... Ces systèmes reposent sur une technologie sophistiquée et fragile, et sont souvent victimes de défaillances techniques, et de maladies catastrophiques.

Cette typologie des systèmes est assez bien définie par Rosenberry (1997), mais les différents auteurs ne s'accordent pas forcément sur les frontières entre ces différents systèmes. Ces désaccords sont une source de confusion et une harmonisation semble souhaitable. Le tableau 1 résume ces différentes définitions :

Tableau 1 : Différentes définitions des systèmes de grossissement des crevettes Pénéides (Fast, 1992 ; Rosenberry, 1997).

(Fast en **gras**, Rosenberry en *italique*)

	Extensif	Semi-intensif	Intensif	Super-intensif
Densité initiale (PL.m ⁻²)	0,1 à 1 <i>< 2,5</i>	3 à 10 <i>10 à 30</i>	15 à 40 <i>> 30</i>	> 100 <i>?</i>
Rendements (tonne.ha ⁻¹ .an ⁻¹)	<0,1 à 0,3 <i>0,05 à 0,5</i>	0,5 à 2,5 <i>0,5 à 5</i>	5 à 15 <i>5 à 20</i>	30 à 150 <i>20 à 100</i>
Alimentation	naturelle <i>naturelle</i>	naturelle + supplément <i>naturelle + supplément</i>	granulé complet <i>granulé complet</i>	granulé complet <i>granulé complet</i>
Renouvellements en eau quotidiens	< 5 % <i>< 5 %</i>	< 5 à 20 % <i>< 1 à 25 %</i>	10 à 20 % <i>jusqu'à > 30 %</i>	> 100 % <i>?</i>
Aération	naturelle <i>naturelle</i>	naturelle <i>naturelle</i>	artificielle <i>artificielle</i>	artificielle <i>artificielle</i>
Taille des bassins	> 5 ha <i>jusqu'à > 100 ha</i>	1 à 20 ha <i>2 à 30 ha</i>	0,25 à 2 ha <i>0,1 à 1,5 ha</i>	< 0,25 ha
nature du fond	terre <i>terre</i>	terre <i>terre</i>	terre ou artificiel <i>terre ou artificiel</i>	artificiel <i>artificiel</i>
Survie	< 60 % <i>?</i>	60 à 80 % <i>?</i>	80 à 90 % <i>?</i>	80 à 90 % <i>?</i>
Technicité	faible <i>faible</i>	modérée <i>modérée</i>	élevée <i>élevée</i>	très élevée <i>très élevée</i>

3. Les facteurs affectant la productivité.

De nombreux facteurs peuvent influencer sur la productivité d'un élevage de grossissement (Rosenberry, 1997). La plupart de ces facteurs auront une importance d'autant plus grande que le système d'élevage sera plus intensifié.

3.1. L'alimentation.

Dans les systèmes traditionnels extensifs, l'alimentation des crevettes est assurée par la productivité naturelle des enceintes d'élevage. Cette production est souvent favorisée par l'apport d'engrais organiques ou minéraux qui vont fournir une alimentation naturelle et riche aux crevettes. Avec l'intensification des systèmes, on l'a vu, cette production naturelle ne peut suffire à assurer la croissance des crevettes en bassins. Dans les systèmes semi-intensifs, cette production naturelle a encore une part probablement significative dans le bol alimentaire des animaux. Dans les systèmes plus intensifs elle devient rapidement négligeable (au moins quantitativement) au cours de la croissance des crevettes. L'aliment "exogène" devient dès lors indispensable, et sa qualité sera d'autant plus déterminante pour la bonne réussite de l'élevage que le système sera intensifié. Les recherches et le développement ont permis la mise au point d'aliments performants, répondant à la majeure partie des besoins de la crevette. Ces aliments industriels constituent un marché mondial d'environ un million de tonnes annuellement, et peuvent représenter jusqu'à 50% des coûts de production. Cette part importante de l'aliment dans les coûts de production, sa richesse en protéines (de 20 à 40%) potentiellement polluantes pour le bassin et l'environnement expliquent les efforts qui sont faits pour abaisser les indices de conversions.

3.2. L'aération.

Dans les systèmes traditionnels extensifs, à nouveau, l'oxygénation de l'eau des bassins est assurée par l'équilibre entre la production diurne par le phytoplancton et la consommation (diurne et surtout nocturne) par l'ensemble des besoins du bassin (demande biologique, mais également demande chimique). Les renouvellements assurés permettent d'obtenir cet équilibre sans oxygénation artificielle. Pour conserver des valeurs d'oxygène correspondant aux besoins physiologiques des crevettes, une oxygénation artificielle est apportée dans les bassins intensifs. Cet apport artificiel est assuré par différents moyens mécaniques de brassage de la colonne d'eau ou d'injection d'air.

3.3. Les maladies.

Elles sont devenues, avec l'intensification, une des contraintes majeures de la pénéculture. L'apparition de maladies virales, leur dissémination (favorisée par des échanges incontrôlés d'animaux vivants à travers le globe) et l'impact souvent "inéluclablement catastrophique" sur les régions productrices atteintes en font maintenant un sujet de préoccupation majeur dans tous les pays producteurs. Les illustrations en sont l'effondrement "précurseur" de la production de Taiwan en 1987-88, et surtout les effondrements de la Chine, de l'Indonésie, de l'Inde dans les années 1993 à 1996 sous l'effet conjugué des virus WSSV et YHV. L'Amérique Latine a également, dans ces mêmes années (1993-96), particulièrement souffert des effets du virus TSV.

Ces virus ont rapidement pris une tournure panzootique à l'échelle d'un continent entier, causant des pertes majeures et par là impressionnantes. Les mortalités bactériennes, plus "discrètes", prélèvent un lourd tribut dans la quasi totalité des élevages, et à tous les stades de développement de la crevette. Fréquemment opportunistes, elles n'occasionnent que très rarement des mortalités totales, présentent une contagiosité moindre, mais affectent probablement "consciencieusement" les crevettes les plus fragiles : fragilisées par leur état physiologique (mauvais déroulement de la mue, mauvaises conditions d'élevage, stress lié à des manipulations, apports nutritionnels inadaptés...). Les germes les plus pathogènes peuvent toutefois être à l'origine d'une mortalité à caractère épizootique.

3.4. La pollution.

D'une manière générale, la pollution anthropique n'a que peu d'effets sur la productivité des bassins d'élevage de crevettes. Elle influe dans certains contextes particuliers sur la qualité microbiologique des crevettes pêchées, limitant les possibilités d'exportation. La pollution qui affecte le plus les fermes de grossissement de crevettes est celle créée par d'autres fermes, parfois par elles-mêmes. L'anarchie dans laquelle la pénéculture s'est développée pendant de longues années a ainsi créé des zones où la proximité des fermes est telle qu'elle interfère négativement sur les résultats de celles-ci. L'eau pompée devient de qualité médiocre, présentant des demandes biologique et chimique en oxygène importantes. Ces problèmes de repompage d'effluents ont en particulier favorisé la rapide dissémination de pathogènes, et sélectionné (par passage en série) les souches les plus virulentes.

3.5. Les contraintes météorologiques.

L'aquaculture de crevettes s'est développée en région circumtropicale où les événements climatiques majeurs ont une incidence maximale. La mousson dans les pays d'Asie du Sud Est, ainsi que la position "El niño" de l'Oscillation Sud El Niño (ENSO) pour l'Amérique Latine semblent favorables à l'industrie crevetticole mondiale, notamment par de meilleures pêches de géniteurs, mais aussi par un lessivage des eaux côtières associé aux fortes pluies.

Toutefois, les événements locaux majeurs (cyclones, moussons, ouragans) peuvent y avoir des effets néfastes, par les dégâts qu'ils sont susceptibles de causer aux fermes de grossissement, aux infrastructures routières... Dans les bassins, la dessalure n'atteint que très rarement des seuils critiques pour les crevettes, mais l'écologie des bassins s'en trouve fortement affectée, pouvant conduire à des mortalités massives. De plus, la houle engendrée dans des bassins de grande surface est susceptible de provoquer des ruptures de digues.

3.6. Conclusion

Les maladies infectieuses, virales ou bactériennes représentent le plus gros frein au développement de la pénéculture. Des stratégies se mettent en place pour limiter leur impact dans les élevages de grossissement. D'autres problèmes existent, dont la place de "maillon faible" des écloseries, d'autant plus marqué que la plupart d'entre elles sont fortement dépendantes des stocks sauvages. La dépendance est également vraie en ce qui concerne les proies vivantes distribuées aux larves aux stades zoophagiques. Cette phase repose sur l'utilisation de nauplii d'*Artemia* spp., dont les cystes représentent un marché de plus en plus spéculatif. Enfin, le développement désordonné des fermes et les conséquences désastreuses qu'elles ont eu sur l'environnement dans de nombreux pays font désormais de la crevette d'élevage une cible pour les lobbies écologistes. Une menace réelle de voir associée à la crevette d'aquaculture une image "anti-écologique" est une nouvelle contrainte pour la pénéculture à travers le monde.

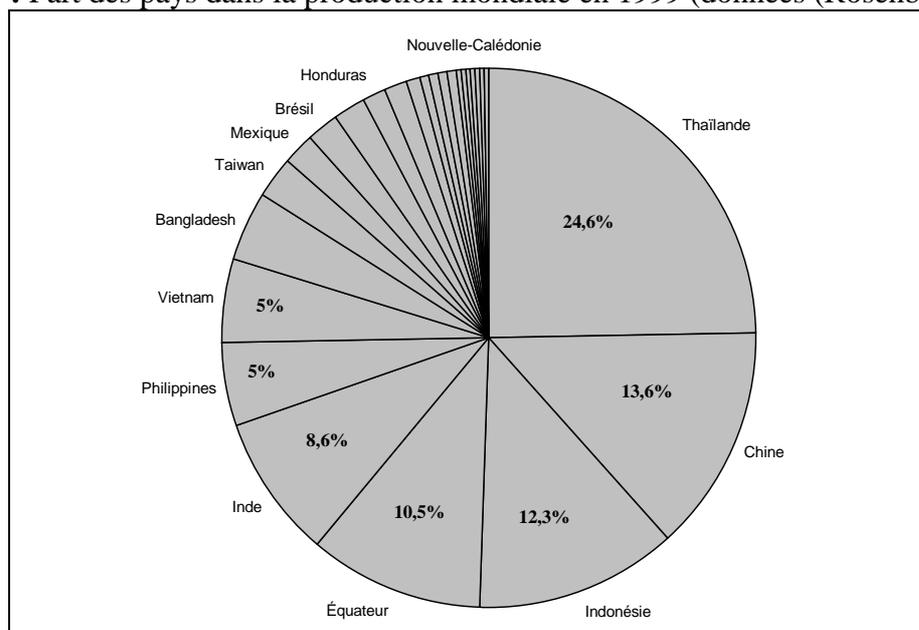
4. Les pays producteurs et la production mondiale.

Ces données sont issues de Rosenberry (1997).

Les exploitations de pénéculture construites au cours des dernières années utilisent quasiment toutes les systèmes semi-intensif ou intensif, et leur part dans la production mondiale de crevettes d'élevage est en hausse constante. Toutefois, la part produite par des pays utilisant

traditionnellement un système extensif n'est pas négligeable, du fait des immenses surfaces mises en élevage. L'exemple de l'Indonésie est parlant : ce pays qui possède la plus grande surface de pénéculture au monde (350 000 hectares) obtient des rendements moyens particulièrement faibles, de 200 à 300 kg.ha⁻¹.an⁻¹. A l'opposé, Madagascar produit plus de 4 500 kg.ha⁻¹.an⁻¹ mais ne réalise qu'une production annuelle totale de 2 500 tonnes. La Thaïlande, premier pays producteur, n'exploite que 80 000 hectares, avec un rendement moyen d'environ 2 500 kg.ha⁻¹.an⁻¹ (voir tableau 1).

Figure 4 : Part des pays dans la production mondiale en 1999 (données (Rosenberry 1998))



Il est intéressant de noter que la moitié de la production mondiale est assurée par 3 pays d'Asie du Sud-Est (Thaïlande [24,6%] ; Chine [13,6%] et Indonésie [12,3%]), et que la région Asie Pacifique a produit à elle seule 79 % de la production aquacole mondiale de crevettes en 1999.

Les gros marchés consommateurs, en dehors du Japon qui représente un marché tout à fait particulier de haut de gamme très exigeant et convoité, sont l'Amérique du Nord et l'Europe Occidentale.

Tableau 2 : L'aquaculture mondiale de crevettes : Surfaces exploitées, tonnages produits, rendements annuels et surface moyenne d'une exploitation dans les principaux pays producteurs et la Nouvelle-Calédonie (Rosenberry, 1997 ; 2000).

Données 1999 sauf pays indiqués par une astérisque (* données 1997, les données 1999 n'étant pas disponibles et Sri Lanka, données 1999 estimées).

Surface exploitée (ha)		Quantité produite (tonnes)		Rendement (kg.ha ⁻¹ .an ⁻¹)		Surface moyenne	
Indonésie	350 000	Thaïlande	200 000	Madagascar	4 639	Madagascar	277
Vietnam	200 000	Chine	110 000	N^{lle}-Calédonie	4 111	Venezuela	167
Chine	180 000	Indonésie	100 000	Japon *	4 000 *	Honduras *	156 *
Bangladesh *	140 000 *	Équateur	85 000	Australie	4 000	Colombie *	140 *
Inde	130 000	Inde	70 000	Taiwan	4 000	Belize *	117 *
Équateur	100 000	Vietnam	40 000	États Unis	3 750	Mexique *	91 *
Thaïlande	80 000	Philippines	40 000	Colombie *	3 571 *	Panama	86
Philippines	60 000	Bangladesh *	34 000 *	Belize *	3 571 *	Équateur	83
Mexique *	20 000 *	Taiwan	20 000	Thaïlande	2 500	Pérou *	71 *
Honduras *	14 000 *	Mexique *	16 000 *	Brésil	2 500	Brésil	55
Nicaragua	6 000	Brésil	15 000	Venezuela	2 000	Nicaragua	46
Brésil	6 000	Honduras *	12 000 *	Pérou *	1 875 *	N^{lle}-Calédonie	41
Taiwan	5 000	Colombie *	10 000 *	Malaisie	1 500	Vietnam	33
Malaisie	4 000	Pérou *	6 000 *	Sri Lanka *	1 200 *	Iran	27
Iran	4 000	Malaisie	6 000	Honduras *	857 *	États Unis	20
Pérou *	3 200 *	Nicaragua	4 000	Équateur	850	Chine	18
Panama	3 000	Venezuela	4 000	Mexique *	800 *	Philippines	15
Colombie *	2 800 *	Madagascar	3 850	Panama	667	Australie	13
Venezuela	2 000	Iran	2 500	Nicaragua	667	Malaisie	5
Madagascar	830	Belize *	2 500 *	Philippines	667	Bangladesh *	4 *
Belize *	700 *	Australie	2 400	Iran	625	Thaïlande	4
Australie	600	Panama	2 000	Chine	611	Japon *	2 *
Sri Lanka *	500 *	N^{lle}-Calédonie	1 850	Inde	538	Indonésie	2
N^{lle}-Calédonie	446	États Unis	1 500	Indonésie	286	Taiwan	2
États Unis	400	Japon *	1 200 *	Bangladesh *	243 *	Sri Lanka *	2 *
Japon *	300 *	Sri Lanka *	1 000 *	Vietnam	200	Inde	1

Au niveau des espèces produites, l'espèce *Penaeus monodon* ("Giant Tiger Prawn") représente à elle seule plus de la moitié de la production mondiale de crevettes d'aquaculture, et est produite partout en Asie, mais aussi en Australie et à Madagascar. Son élevage est extrêmement dépendant des pêcheries, car elle est réputée difficile à domestiquer. *Litopenaeus vannamei* ("Pacific White Shrimp") est la seconde espèce en importance des tonnages produits (environ 25 %), et est exploitée principalement en Amérique Latine. Plusieurs lignées domestiquées sont disponibles à travers le monde, et elles sont à la base d'un commerce florissant. *Fenneropenaeus chinensis* représente 8 % de la production aquacole mondiale. Elle présente la particularité de croître jusqu'à des températures assez basses, de l'ordre de 16°C. De même, elle est plus tolérante que *P. monodon* et *L. vannamei* aux mauvaises conditions d'élevage, et aux dessalures. *Litopenaeus stylirostris* ne représente quant à elle qu'environ 3 % de la production mondiale. Elle a été élevée en grandes quantités en Amérique Latine, puis abandonnée au profit de *L. vannamei* qui est beaucoup moins sensible au virus IHNV. Depuis les ravages causés par le virus Taura, elle reprend de l'importance, en raison de sa sensibilité bien moindre à ce second virus. *L. stylirostris* et *L. vannamei* sont souvent vendues ensemble comme "crevettes blanches". Les autres espèces ne représentent que de faibles parts de la production aquacole mondiale. *Marsupenaeus japonicus*, qui ne représente qu'une part très faible du tonnage produit, se situe sur un marché particulier. Cette espèce est généralement vendue vivante au Japon, et des techniques de transport des crevettes vivantes sans eau ont été développées pour cette espèce. Les prix en sont très variables, et une véritable spéculation existe sur cette espèce, qui s'explique par des prix qui peuvent atteindre 200 US\$ par kg ! Elle présente en outre la particularité d'avoir une croissance jusqu'à des températures aussi basses que 10°C, ce qui en fait un candidat pour des élevages extra-tropicaux. Elle est notamment parfois élevée dans les claires ostréicoles dans l'ouest de la France.

5. Historique de la pénéculture mondiale

Les origines de la pénéculture remontent à plusieurs siècles. En Asie du Sud Est, l'élevage traditionnel de poissons, reposant sur l'observation et l'utilisation de la biologie des espèces, permettait la récolte de crevettes sauvages entrées incidemment dans les lagunes aménagées en bassins piscicoles. Dans les années 1930, M. Fujinaga de l'université de Tokyo obtient une ponte et réussit à produire des *Marsupenaeus japonicus* jusqu'à une taille commerciale. Ses travaux poursuivis sur plusieurs années et largement publiés lui ont valu le surnom de "père de

la crevetticulture moderne ”. Aujourd’hui, bien que le Japon ne soit pas devenu un des grands pays producteurs, il détient toujours le record mondial des rendements en élevage de crevettes avec près de 4 000 kg.ha⁻¹.an⁻¹.

Dans les années 1950 et 1960, les États-Unis occupent le devant de la scène de la pénéculture par les travaux du laboratoire de Galveston, au Texas. Initialement dédié à l’étude du phytoplancton toxique, il mit au point en 1958 la technique (désormais célèbre) d’élevage larvaire de crevettes Pénéides utilisant des cultures d’algues, qui prit le nom de “ technique de Galveston ”.

Depuis la fin des années 1960 et le début des années 1970, la Chine et surtout la France au Centre Océanologique du Pacifique à Tahiti, ont commencé un travail de fond sur les possibilités d’aquaculture de crevettes de mer, en réponse au déclin des prises des pêcheries. Dès cette époque, le Centre Océanologique du Pacifique à Tahiti a du importer des crevettes Pénéides, absentes du lagon tahitien. Leurs travaux, largement publiés sous le nom collectif d’AQUACOP, ont permis rapidement la maîtrise du cycle complet des espèces captives. Cette maîtrise permet maintenant à l’IFREMER-COP de posséder des souches en voie de domestication parmi les plus “ anciennes ” au monde, pour les espèces *Penaeus monodon*, *Litopenaeus stylirostris*, *L. vannamei* et *Fenneropenaeus indicus* ((AQUACOP 1975) ; (AQUACOP 1979). Les travaux de cette période réalisés en Chine sont restés beaucoup plus discrets (voire secrets) jusqu’au milieu des années 1980, où ils aboutirent à la production de très importantes quantités de *Fenneropenaeus chinensis* dans de grands bassins semi-intensifs en Chine et de *P. monodon* dans de petits bassins intensifs à Taiwan. Dans le même temps, les États-Unis ont intensifié leurs travaux sur la pénéculture par la mise en place de programmes “ crevettes ” dans les universités notamment celles d’Hawaï et d’Arizona. C’est également au cours de cette période que la pénéculture a commencé à se développer en Amérique Latine (Honduras, Panama et Équateur) sous l’impulsion de gros investisseurs, notamment de producteurs d’aliments industriels pour animaux. Les recherches se portent dès cette époque vers la pathologie, mais aussi la nutrition, l’amélioration des techniques d’élevage larvaire et de grossissement. Ainsi, vers le milieu des années 1970, les connaissances nécessaires à l’essor d’une activité industrielle sont acquises. Les deux décennies suivantes voient le développement rapide de cette activité. Comme signalé plus haut, les années suivantes verront également pointer un certain nombre de limites à cet essor désordonné, et l’apparition de pathologies dévastatrices. Ainsi, le déclin de Taiwan dans les années 1987-1988 (de 100 000 à 20 000 tonnes annuelles), mais surtout la stagnation voire la régression au niveau mondial dans les

années 1993 à 1996 sont principalement attribuables à des pathologies infectieuses dans lesquelles les composantes environnementales ont joué un rôle majeur. Ainsi, au début des années 1990, les zones d'élevages au Sud de Bangkok en Thaïlande ont pratiquement toutes été abandonnées à cause de la pollution des eaux, notamment due à la multiplication désordonnée des fermes intensives. Ces déclin massifs à l'échelle de pays entiers ont atteints des pays d'Asie (Chine, Taiwan, à un moindre degré Thaïlande et Indonésie). La promiscuité entre les fermes intensives rend le pompage d'une eau de qualité suffisante impossible. Au niveau des agents pathogènes, le passage en série sur des hôtes sensibles sélectionne les germes les plus virulents. Suivant le même schéma, les grandes zones de production d'Amérique Latine (Golfe de Guayaquil en Équateur, Golfe de Fonseca au Honduras) pourraient, un jour prochain, connaître à leur tour ce type de pathologie dévastatrice.

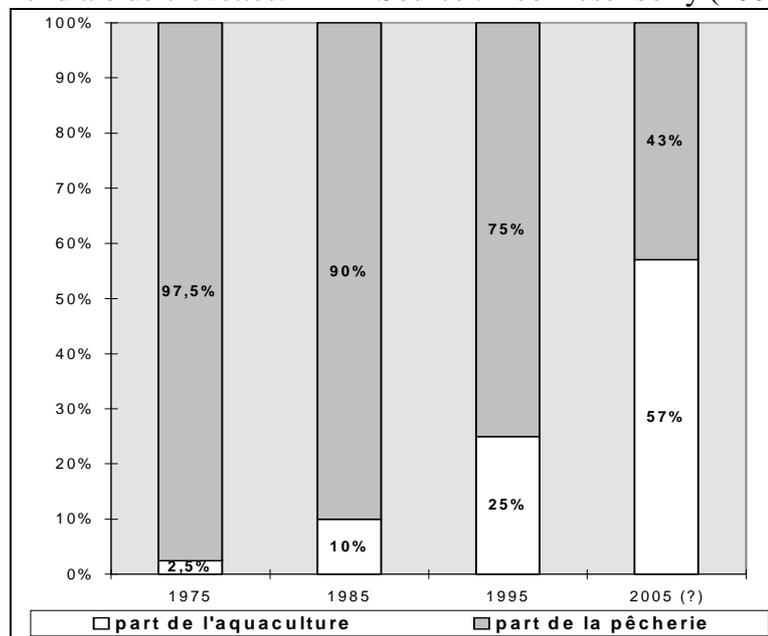
Au début des années 1990, plusieurs pays ont développé la pénéculture comme activité nouvelle (Vietnam, Inde, Mexique, Colombie, Honduras, Madagascar notamment). Malgré cette augmentation du nombre de pays producteurs, la production mondiale n'a presque plus évolué entre 1992 et 1997, stabilisée aux alentours de 700 000 tonnes annuelles, représentant environ 25 % de la fourniture mondiale de crevettes.

En réponse à ces problèmes, des schémas d'aménagement littoraux, des contrôles sanitaires, des technologies nouvelles se mettent en place. Le recours à des souches domestiquées depuis plusieurs générations, à l'historique connu tant au niveau du statut sanitaire que des performances zootechniques attendues devient une démarche fréquente dans les pays producteurs. Un marché florissant de souches indemnes d'organisme pathogène spécifique (IOPS ou SPF pour Specific Pathogen Free) et de souches résistantes à différents virus se développe pour répondre à cette nouvelle demande. Ce marché devrait dans la décennie prochaine connaître encore de nouveaux développements.

Le marché mondial de la crevette a ainsi connu une croissance de 300 % entre 1975 et 1985 et de 250 % entre 1985 et 1995, malgré des récessions spectaculaires. Il représente 2,5 à 3 millions de tonnes annuelles depuis 1990. La demande est en hausse à un moment où les captures de la pêche plafonnent. L'aquaculture, alternative logique, est pour sa part en constante progression depuis les années 1970. Sous l'effet conjugué de ces deux phénomènes, la part de l'aquaculture dépasserait, si sa croissance était de 200 % entre 1995 et 2005, les 50 % de la fourniture mondiale de crevettes en 2005. La prudence reste toutefois de mise, puisque des auteurs (Fast et Lester, 1992) prévoyaient que 45 % de la crevette mondiale serait fournie par

l'aquaculture dès l'année 2000. Or, selon les prévisions actuelles, cette part ne devrait pas dépasser 35 %, du fait, encore une fois, des maladies infectieuses.

Figure 5 : Évolution des parts relatives de l'aquaculture et de la pêche dans la production mondiale de crevettes. Source : Bob Rosenberry (2000)



6. L'aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie.

6.1. Historique

Ce paragraphe reprend des éléments de (Anonyme 1998)

En Nouvelle-Calédonie, l'aquaculture de crevettes a débuté en 1970, à l'instigation des gouvernements membres de la Commission du Pacifique Sud (CPS) et sous l'égide de l'Organisation Mondiale pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). La Station d'Aquaculture de Saint-Vincent (SASV) fut créée à cette occasion. C'est à la même époque que le Centre Océanologique du Pacifique était bâti par l'IFREMER (CNEXO à l'époque) à Tahiti.

En 1973, à l'expiration du programme CPS/FAO, les installations de la SASV furent remises au Territoire qui en confia la gestion à l'Association pour le développement de l'Aquaculture en Nouvelle-Calédonie (AQUACAL). L'IFREMER en assura dès lors la direction scientifique et technique et apporta un concours financier sous forme de contrats dont la vocation était la recherche et l'aide au développement.

Depuis, l'IFREMER contractualise régulièrement avec le Territoire de Nouvelle-Calédonie (puis avec les Provinces à partir de 1990) les programmes de recherche de cette Station.

Les activités de recherche de la SASV et du COP ont permis, à partir des années 1980, le développement en Nouvelle-Calédonie d'une activité privée d'aquaculture de crevettes.

- En 1981, la première ferme artisanale de grossissement voit le jour en Baie de Saint Vincent : la ferme Chevalier.
- En 1983, sur l'initiative de l'IFREMER, et par le biais de sa filiale de développement " France Aquaculture ", la première ferme industrielle de grossissement est créée à Moindou : la Société d'Aquaculture Calédonienne (SODACAL).
- En 1984, la première fabrication industrielle d'aliment pour crevettes est effectuée par la société SICA.
- En 1988, la première éclosérie industrielle est mise en place par France Aquaculture sur le site de la SODACAL à Moindou. Cette même année, la production de crevettes, qui atteint 280 tonnes, permet les premières exportations (73 tonnes) et la mise en place d'un atelier de conditionnement à Nouméa.

Dix ans plus tard, la Nouvelle-Calédonie a produit en 1998 environ 1600 tonnes de crevettes sur 10 fermes couvrant une surface de 450 hectares. Cette production "record" pour la Nouvelle-Calédonie ne représente pourtant que 0,25 % de la production aquacole mondiale de crevettes...

Figure 6 : Localisation géographique des implantations aquacoles en Nouvelle-Calédonie.

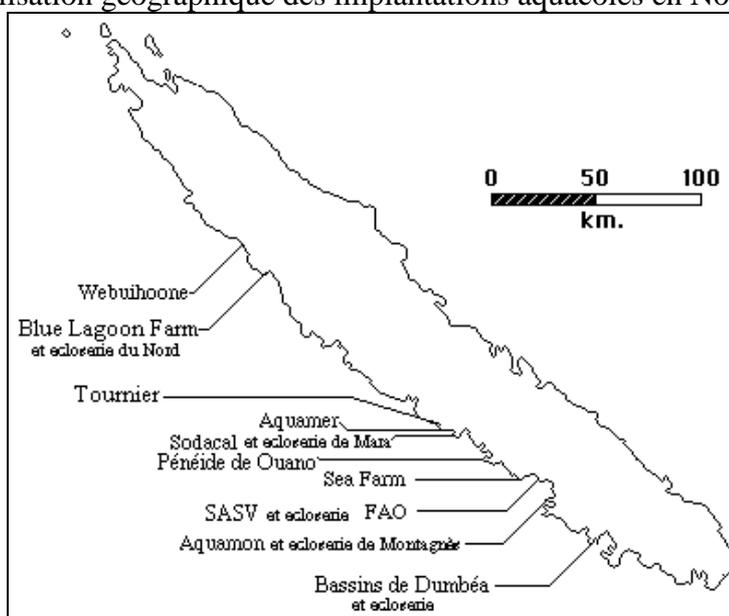
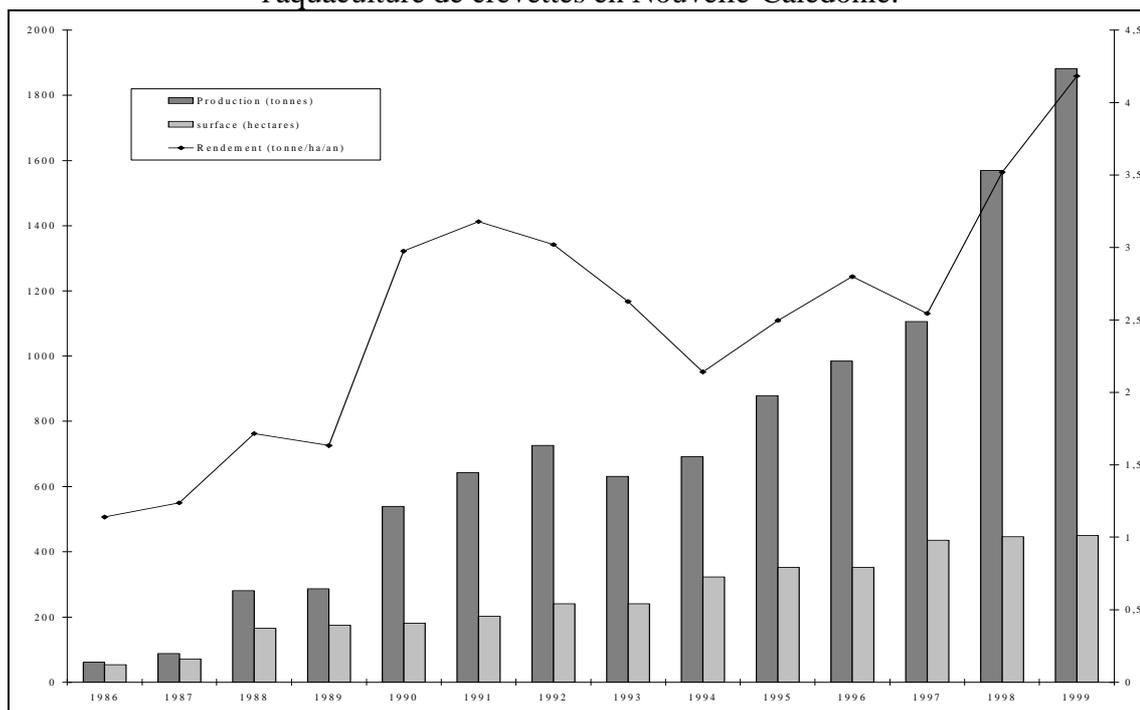


Figure 7 : Évolution des surfaces exploitées, productions annuelles et rendements de l'aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie.

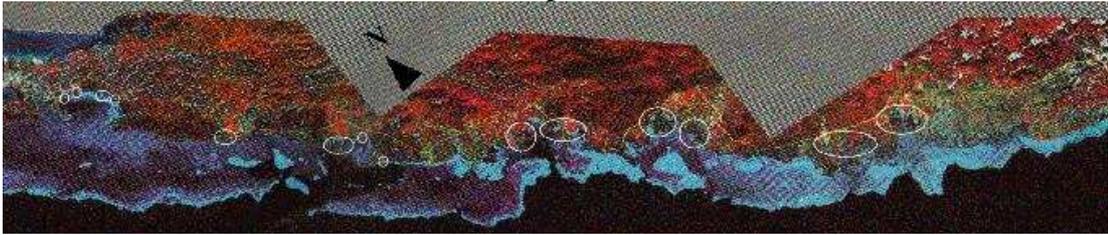


À l'échelle du Territoire toutefois, cette activité présente de nombreux intérêts :

- Elle permet la création d'emplois en dehors de la conurbation Nouméenne (gestion des élevages ; pêches ; fabrication d'aliments...) ; ces emplois étaient estimés en 1997 à 150 emplois directs et 100 emplois indirects (Coatanéa; Farman, and Galinié 1997).
- Elle valorise des sites non exploitables par l'agriculture (zones désertiques sursalées en arrière des mangroves) ;
- Elle représente le second secteur à l'exportation du Territoire (après le nickel), et générait en 1996 un chiffre d'affaires de plus de 10 millions US\$ (Coatanéa *et al.*, 1997).

Cette activité présente encore un bon potentiel de développement sur le Territoire, principalement dans la Province Nord où se situent la majorité des sites aménageables. Elle peut prétendre constituer pour le Territoire un outil majeur de rééquilibrage. Plus de 1500 hectares seraient encore aménageables en fermes aquacoles, principalement en Province Nord. Ces sites ont été répertoriés par une étude en télédétection : un inventaire des sites favorables à l'aquaculture et une étude de détail des 18 sites aménageables en priorité ont été réalisés en 1989 dans le cadre du programme ALIAS (IFREMER), réalisé à partir des images prises par le satellite SPOT. L'objectif d'une production annuelle d'environ 5 000 tonnes à l'issue de la prochaine décennie est affichée et semble être réalisable.

Figure 8 : Inventaire des sites par télédétection (étude ALIAS)



6.2. Choix de l'espèce élevée en Nouvelle-Calédonie

Une dizaine d'espèces de crevettes Pénéides sont autochtones dans les eaux calédoniennes. Les travaux des pionniers ont tout d'abord porté sur ces espèces (*Penaeus semisulcatus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Metapenaeus ensis*, *Melicertus latisulcatus* notamment). Ces espèces indigènes se sont montrées peu performantes (croissance lente en bassins) et / ou peu adaptées à une valorisation aquacole (comportements fouisseurs rendant les récoltes très délicates). Le recours à des espèces importées, vers la fin des années 1970 a permis de sélectionner une espèce d'Amérique latine, *Litopenaeus stylirostris*, qui est la seule actuellement élevée de façon industrielle. Choisie pour ses bonnes performances de croissance jusqu'à 25 ou 30 g aussi bien en saison fraîche qu'en saison chaude, elle est appréciée sur le marché international où elle ne représente qu'environ 3% des crevettes d'aquaculture.

Le recours à cette espèce exotique a nécessité la maîtrise de l'ensemble du cycle biologique en captivité, maîtrise dans laquelle les travaux de la SASV et de l'IFREMER-COP ont été déterminants, à côté des autres grands découvreurs qu'ont été le laboratoire de Galveston au Texas et, bien plus tôt encore, l'Université de Tokyo. Depuis l'importation de cette espèce sur le Territoire en 1978, plus de 30 générations ont été obtenues en captivité.

6.3. Les facteurs limitant le développement

Parmi les obstacles rencontrés au cours du développement d'une filière commerciale de pénéculture en Nouvelle-Calédonie, nous verrons en détail le problème pathologique majeur, apparu en 1993 et qui a reçu le nom de Syndrome 93.

En outre, les coûts de production de crevettes en Nouvelle-Calédonie sont beaucoup plus élevés que dans la majorité des pays producteurs. Ce fait est dû principalement aux coûts élevés des

intrants (main d'œuvre, aliment et énergie), qui se répercutent à tous les niveaux (écloseries, fermes de grossissement, atelier de conditionnement...). Un autre élément influant sur ces coûts de production élevés est la taille modeste de la plupart des fermes, ne permettant pas d'économie d'échelle, en comparaison des fermes d'Amérique Latine qui produisent la même espèce.

Au niveau des marchés, ces coûts de production élevés obligent à viser des créneaux "haut de gamme" au Japon, en Australie et en Europe. Afin de ne pas entrer en concurrence avec les *Litopenaeus vannamei* d'Amérique Latine pêchées aux alentours de 15 à 20 grammes, les producteurs calédoniens sont encouragés à produire des crevettes de calibre supérieur (20-25 grammes). A ce niveau également, le tonnage modeste de la production calédonienne ne permet pas de fidéliser des clients intéressés par des quantités importantes tout au long de l'année.

