

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE NANTES

2003

L'ÉLEVAGE LARVAIRE DE CREVETTES EN
NOUVELLE - CALÉDONIE

L'Oxytétracycline et l'association Triméthoprime – Sulfadiazine en
tant qu'alternatives à l'emploi de l'Érythromycine en éclosion

THÈSE
pour le
diplôme d'État
de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 18 décembre 2003
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Cyrille FRANÇOIS

Né le 29 juin 1975 à MONTBÉLIARD (25)

JURY

Président : Madame Pascale JOLLIET,
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Monsieur Hervé LE BRIS,
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes
Monsieur Hervé POULIQUEN,
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes

Remerciements

À Madame Pascale JOLLIET, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse.

À Monsieur Hervé LE BRIS, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes, pour m'avoir encadré tout au long de cette étude.

À Monsieur Hervé POULIQUEN, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes pour la lecture attentive de cette étude et ses commentaires constructifs.

À Guillaume BLANC et Etienne GIRAUD pour l'attention qu'ils ont portée à ce travail.

À Yves HARACHE, Cyrille GOARANT, Dominique PHAM, Dominique ANSQUER, José HERLIN, Frédéric IMBERT, Jean – René MAILLEZ et à toute l'équipe IFREMER de Nouvelle – Calédonie.

Aux aquaculteurs du Groupement des Fermes Aquacoles de Nouvelle – Calédonie.

Je dédie cette thèse à mes parents en remerciement de leur soutien tout au long de mes études. Avec toute ma reconnaissance et mon affection.

Sommaire

Remerciements.....	2
Sommaire.....	3
Liste des illustrations.....	7
Introduction.....	10
I - LA PÉNÉCULTURE EN NOUVELLE-CALÉDONIE.....	12
1.1 – Une activité en pleine expansion.....	12
1.2 – L’accompagnement scientifique.....	15
II - PRÉSENTATION DE L’ESPÈCE.....	16
2.1 - Nomenclature et systématique.....	16
2.2 - Origine et distribution géographique.....	16
2.3 - Morphologie.....	16
2.4 - Cycle biologique en milieu naturel.....	18
2.4.1 – Caractères sexuels et reproduction.....	18
2.4.3 – Ponte.....	19
2.4.4 – Nauplius.....	20
2.4.5 - Zoé.....	20
2.4.6 - Mysis.....	21
2.4.7 - Post-larves.....	22
2.4.8 - Adultes.....	23
III - LES TECHNIQUES D’ÉLEVAGE.....	23
3.1 - Élevage des géniteurs.....	23
3.1.1 - Phase pré-géniteur.....	24
3.1.2 - Phase géniteur.....	24
3.2 - Reproduction assistée.....	26
3.2.1 - Maturation des géniteurs.....	26
3.2.2 - Épédonculation.....	27
3.2.3 - Détermination des stades de maturité sexuelle.....	28
3.2.4 - Insémination artificielle.....	29
3.2.5 - Ponte.....	31
3.2.6 - Récupération des pontes.....	32
3.3 - Élevage larvaire.....	33
3.3.1 - Préparation des bacs.....	33
3.3.2 – Séquence alimentaire.....	34
3.3.3 - Traitements.....	34
3.3.4 - Changements d’eau.....	34
3.3.5 - Vérification de la formule rostrale avant le transfert en nurserie.....	34
3.3.6 - Vide sanitaire.....	35
3.4 – Nurserie.....	35
I - LE CHOIX DES ANTIBIOTIQUES DE SUBSTITUTION.....	38
1.1- Origine de l’emploi des antibiotiques en élevage larvaire de crevettes :.....	38
1.2 – Critères de sélection du principe actif :.....	38
1.2.1 – Activité antibactérienne.....	38
1.2.2 - Innocuité pour les larves de crevettes et pour l’environnement.....	39

1.2.3 - Développement de résistances.....	39
1.2.4 - Respect de la réglementation française et communautaire.....	39
1.3 – Critères de sélection de la spécialité pharmaceutique vétérinaire :.....	40
1.3.1 - Teneur en principe actif.....	40
1.3.2 - Absence d'effet adverse des excipients.....	40
1.3.3 - Forme galénique appropriée et disponibilité en grand conditionnement.....	41
1.3.4 - Coût raisonnable.....	41
II - L'OXYTÉTRACYCLINE.....	42
2.1 - Pharmacie chimique :.....	42
2.1.1 - Structure.....	42
2.1.2 - Propriétés physiques.....	42
2.1.3 - Propriétés chimiques.....	43
2.2 – Pharmacologie :.....	45
2.2.1 - Pharmacocinétique.....	45
2.2.2 – Activité antibactérienne.....	45
2.2.3 - Effets indésirables et toxiques.....	46
2.2.4 - Résidus.....	46
2.3 – Thérapeutique :.....	46
2.3.1 - Indications.....	46
2.3.2 - Mode d'administration et posologie.....	46
2.3.3- Spécialités pharmaceutiques vétérinaires éligibles.....	46
III - L'ASSOCIATION TRIMÉTHOPRIME (1) – SULFADIAZINE (5).....	48
3.1– Pharmacie chimique :.....	48
2.1.1 - Structures.....	48
3.2.2 - Propriétés physiques.....	48
3.2.3 - Propriétés chimiques.....	49
3.2 – Pharmacologie :.....	50
3.2.1 - Pharmacocinétique.....	50
3.2.2 – Activité antibactérienne.....	50
3.2.3 - Effets indésirables et toxiques.....	51
3.2.4 - Résidus.....	51
3.3 – Thérapeutique :.....	51
3.3.1 - Indications.....	51
3.3.3 – Mode d'administration et posologie.....	52
3.3.4 – Spécialité pharmaceutique vétérinaire éligible.....	52
I – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	55
1.1 - Préparation des géloses avec antibiotiques :.....	55
1.2 – Prélèvements d'eau d'écloseries :.....	56
1.3 - Dilutions d'eau d'écloserie :.....	56
1.4 - Essai en parallèle érythromycine / oxytétracycline / triméthoprime - sulfadiazine :.....	57
1.5 - Courbes "Dénombrement bactérien en fonction de la concentration en antibiotique" :.....	57
II - RÉSULTATS.....	58
2.1 – Courbes " Dénombrement bactérien en fonction de la concentration en antibiotique " :.....	58
2.1 – Incident lors de l'étude de la sensibilité de la flore Vibrionacée à l'oxytétracycline :.....	59
III - DISCUSSION.....	60
3.1 – Variabilité de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution :.....	60
3.1.1 - Sensibilité de la flore hétérotrophe totale.....	60
3.1.2 - Sensibilité de la flore Vibrionacée.....	60
3.2 – Détermination des concentrations d'essai Cotc et Ctmpsulfa :.....	61
IV – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	62

I – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	63
1.1 - Informations sur les antibiotiques testés :.....	63
1.2 - Déroulement de l'essai :.....	63
1.2.1 - Conditions d'exposition.....	63
1.2.2 - Dénombrement et choix des larves.....	64
1.2.3 - Préparation des solutions d'antibiotiques.....	64
1.2.4 – Observations.....	65
1.2.5 – Traitement des résultats.....	65
II - RÉSULTATS.....	66
2.1 – Première série d'essai :.....	66
2.1.1 – Suivi des paramètres de milieu.....	66
2.1.2 – Suivi de la mortalité larvaire.....	66
2.1.3 – Distribution des stades larvaires en fin d'essai.....	68
2.2 – Deuxième série d'essai :.....	68
2.2.1 - Suivi des paramètres de milieu.....	68
2.2.2 – Suivi de la mortalité larvaire.....	69
2.2.3 – Distribution des stades larvaires en fin d'essai.....	70
2.3 - Troisième série d'essai :.....	71
2.3.1 - Suivi des paramètres de milieu sur 24 heures.....	72
2.3.2 – Suivi de la mortalité larvaire sur 24 heures.....	72
2.3.3 - Droites « mortalité à 24 heures en fonction de la dose » après transformation log-probit ».....	73
III - DISCUSSION.....	74
3.1 - Modifications apportées à la gamme de concentrations d'essai :.....	74
3.2 – Sécurité d'emploi des antibiotiques aux concentrations usuelles de traitement :.....	75
3.3 – Détermination des CL50 :.....	75
IV – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	76
.....	76
I – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	77
1.1 - Protocoles testés au cours de la production 0303 :.....	77
1.2 - Protocoles testés au cours de la production 0304 :.....	78
1.3 - Protocoles testés au cours de la production 0305 :.....	79
II - RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	80
2.1 - Résultats et discussion de la production 0303 :.....	80
2.1.1 – Survie larvaire estimée.....	80
2.1.2 – Distribution des stades larvaires.....	82
2.1.3 Dénombrements bactériens.....	82
2.2 - Résultats et discussion de la production 0304 :.....	85
2.2.1 – Survie larvaire estimée.....	85
2.2.2 – Distribution des stades larvaires.....	85
2.3 - Résultats et discussion de la production 0305 :.....	87
2.3.1 – Survie larvaire estimée.....	88
2.3.2 – Distribution des stades larvaires.....	89
III – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	91
Conclusion générale.....	92
Références bibliographiques.....	94
Bibliographie complémentaire.....	96
ANNEXE 1 : La Filière crevetticole de Nouvelle-Calédonie.....	98
ANNEXE 2 : Présentation des antibiotiques.....	103
ANNEXE 3 : Sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution.....	105

<u>ANNEXE 4 : Innocuité et détermination des CL50.....</u>	<u>106</u>
<u>ANNEXE 5 : Efficacité.....</u>	<u>110</u>

Liste des illustrations

- Figure 1 : carte des fermes de production de crevettes
Figure 2 : morphologie externe d'une crevette Pénéide
Figure 3 : dimorphisme sexuel chez les crevettes matures (vue ventrale)
Figure 4 : cycle biologique en milieu naturel
Figure 5 : appréciation de la qualité des œufs
Figure 6 : six stades Nauplius
Figure 7 : trois stades Zoé
Figure 8 : trois stades Mysis
Figure 9 : post-larve
Figure 10 : différents stades de maturité sexuelle chez la femelle
Figure 11 : structure de l'oxytétracycline
Figure 12 : solubilité de l'oxytétracycline
Figure 13 : chélation de l'oxytétracycline
Figure 14 : caractère amphotère à prédominance basique de l'oxytétracycline
Figure 15 : stabilité et persistance dans l'eau de l'oxytétracycline
Figure 16 : structure du triméthoprim
Figure 17 : structure de la sulfadiazine
Figure 18 : caractère basique du triméthoprim
Figure 19 : caractère amphotère à prédominance acide de la sulfadiazine
Figure 20 : action antibactérienne séquentielle de l'association triméthoprim – sulfadiazine
Figure 21 : détermination de la concentration d'essai pour l'antibiotique de substitution
Figure 22 : innocuité des antibiotiques de substitution vis-à-vis des larves de *Litopenaeus stylirostris*
- Tableau I : surfaces totales des fermes au cours des quatre dernières campagnes de production en hectares (ha)
Tableau II : production des fermes par campagne du 1 septembre au 31 août en tonnes (t)
Tableau III : spectre antibactérien de l'oxytétracycline
Tableau IV : spécialités pharmaceutiques vétérinaires éligibles à base d'oxytétracycline
Tableau V : spectre antibactérien de l'association triméthoprim – sulfadiazine
Tableau VI : spécialité pharmaceutique vétérinaire éligible à base de triméthoprim – sulfadiazine
Tableau VII : préparation des solutions d'antibiotiques
Tableau VIII : préparation des gélules
Tableau IX : détermination des concentrations C à partir des courbes de résistance de la flore hétérotrophe totale
Tableau X : détermination des concentrations C à partir des courbes de résistance de la flore Vibrionacée
Tableau XI : conditions d'exposition des larves aux antibiotiques lors des essais d'innocuité
Tableau XII : séquence alimentaire durant les essais d'innocuité
Tableau XIII : gamme de concentrations et pesée des antibiotiques
Tableau XIV : suivi de la mortalité larvaire lors du troisième essai d'innocuité mené sur les larves Zoé2 du LAC Saint-Vincent
Tableau XV : encadrement des CL₅₀_{24h} du chlorhydrate d'oxytétracycline et du Trimsul ND pour les stades larvaires de *Litopenaeus stylirostris* étudiés

Tableau XVI : protocoles testés en petits volumes 150 L lors de la production 0303
Tableau XVII : protocoles testés en grands volumes 2 m³ lors de la production 0303
Tableau XIII : protocoles testés en petits volumes 150 L lors de la production 0304
Tableau XIX : protocoles testés en petits volumes 150 L lors de la production 0305
Tableau XX : protocoles testés en grands volumes 2 m³ lors de la production 0305
Tableau XXI : protocoles testés en grands volumes 3 et 4 m³ lors de la production 0305

Graphe 1 : courbe de résistance de la flore hétérotrophe totale de l'écloserie du Nord
Graphe 2 : courbe de résistance de la flore Vibrionacée de l'écloserie du LAC Saint – Vincent
Graphe 3 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (premier essai avec les larves Zoé2)
Graphe 4 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (premier essai avec les larves Mysis1)
Graphe 5 : distribution des stades larvaires à l'issue du premier essai sur les larves Mysis1
Graphe 6 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (deuxième essai avec les larves Zoé2)
Graphe 7 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (deuxième essai avec les larves Mysis1)
Graphe 8 : distribution des stades larvaires à l'issue du second essai sur les larves Zoé2
Graphe 9 : distribution des stades larvaires à l'issue du second essai sur les larves Mysis1
Graphe 10 : transformation log-probit et mortalité à 24 h des larves Zoé2 avec l'oxytétracycline
Graphe 11 : transformation log-probit et mortalité à 24 h des larves Zoé2 avec le Trimsul ND
Graphe 12 : survie larvaire estimée dans les scobs de 150 L à J5, J10, J14, J18 lors de la production 0303
Graphe 13 : survie larvaire estimée en bacs de 2 m³ à J5, J10, J15 lors de la production 0303
Graphe 14 : distribution des stades larvaires à J13 dans les scobs de 150 L lors de la production 0303
Graphe 15 : suivi de la flore hétérotrophe totale dans les scobs de 150 L
Graphe 16 : suivi de la flore vibrionacée dans les scobs 150 L
Graphe 17 : suivi de la flore hétérotrophe totale dans les bacs de 2 m³
Graphe 18 : suivi de la flore Vibrionacée dans les bacs de 2 m³
Graphe 19 : survie larvaire estimée dans les scobs de 150 L à J5, J10, J14, J18 lors de la production 0304
Graphe 20 : distribution des stades larvaires à J12 lors de la production 0304
Graphe 21 : taille des larves P10 à J21 lors de la production 0304
Graphe 22 : formule rostrale des larves P10 à J21 lors de la production 0304
Graphe 23 : survie larvaire estimée dans les scobs de 150 L à J5, J10, J14, J18 lors de la production 0305
Graphe 24 : survie larvaire estimée en bacs de 2-4 m³ à J5, J10, J15 lors de la production 0305
Graphe 25 : formule rostrale des larves P10 dans les scobs de 150 L à J18 lors de la production 0305
Graphe 26 : formule rostrale des larves P10 dans les bacs de 2-4 m³ à J18 lors de la production 0305

- Photo 1 : bassins de grossissement à la ferme SODACAL
- Photo 2 : vue aérienne du LAC Saint-Vincent
- Photo 3 : bassins d'élevage des géniteurs du LAC Saint-Vincent
- Photo 4 : spécimen géniteur de *Litopenaeus stylirostris*
- Photo 5 : salle de maturation des géniteurs femelles à l'écloserie de Mara
- Photo 6 : technique d'épédonculation d'un géniteur
- Photo 7 : coloration orange et grande taille des ovaires chez la femelle mature
- Photo 8 : prélèvement des spermatophores chez le mâle
- Photo 9 : dépôt du sperme au-dessus du thélycum au niveau de l'avant dernière paire de péréiopodes
- Photo 10 : pondoirs individuels cylindro-coniques et récupération de la ponte
- Photo 11 : éclosoir et phototropisme des larves
- Photo 12 : salle d'élevage larvaire au LAC Saint-Vincent
- Photo 13 : dents disposées sur le rostre (formule rostrale)
- Photo 14 : « moulinette » du LAC Saint-Vincent

Introduction

« ...Toutes les fermes de grossissement achètent leurs post-larves auprès des trois écloseries privées de Nouvelle-Calédonie. Ces écloseries sont obligées d'utiliser à titre préventif un antibiotique à des doses très faibles et uniquement à certains stades. Dans l'attente d'une solution probiotique, elles souhaiteraient disposer de molécules de remplacement si celle utilisée actuellement devenait moins efficace. Ces nouvelles molécules doivent obligatoirement être compatibles avec les cahiers des charges qualité de la filière crevette-export de Nouvelle Calédonie... » (comm. pers., Fonfreyde C., animateur du Groupement des Fermes Aquacoles de Nouvelle-Calédonie (GFA))

L'aquaculture de la crevette Pénéide occupe une position majeure au sein des productions animales avec 1 087 000 tonnes de crevettes produites en 2000 pour un chiffre d'affaires équivalent à sept milliards d'euros. (FAO 2002). La Nouvelle-Calédonie participe activement à cette production grâce au développement de l'élevage de la crevette bleue du Pacifique *Litopenaeus stylirostris*. Le cycle d'élevage est étroitement dépendant du bon approvisionnement en larves de crevettes, qui est assuré par l'écloserie. En l'état actuel de nos connaissances, l'élevage larvaire de crevettes ne peut être mené sans l'utilisation d'antibiotique. L'ajout d'érythromycine dans l'eau d'élevage garantit un bon développement des larves, ce qui suppose qu'elle exerce une influence sur l'écologie bactérienne du milieu d'élevage. Cependant, certains écloseries de Nouvelle – Calédonie ont noté une moins bonne efficacité du protocole de référence et l'hypothèse d'un développement d'antibiorésistances à l'érythromycine a été émise.

C'est à l'initiative du Groupement des Fermes Aquacoles de Nouvelle-Calédonie (GFA) et de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la mer (IFREMER), en relation avec l'Unité Mixte Chimiothérapie Aquacole et Environnement (UMR CAE) que j'ai eu l'occasion de mener l'étude présentée dans ce mémoire. L'objectif premier de cette étude est d'obtenir deux plans d'antibioprévention, en substitution du protocole à base d'érythromycine, qui répondent aux difficultés rencontrées en élevage larvaire de crevettes.

Ce document s'articule autour de trois parties :

- La première partie est une présentation de la crevette culture calédonienne. Les principales caractéristiques de l'espèce *Litopenaeus stylirostris* et les techniques d'élevage larvaire y sont également décrites.
- La seconde partie est une présentation du chlorhydrate d'oxytétracycline et de l'association triméthoprime - sulfadiazine qui ont été retenus pour remplacer l'érythromycine. Les critères qui ont dicté le choix de ces médicaments ainsi que les caractéristiques détaillées des principes actifs sont exposés.
- La dernière partie présente les expériences menées au Laboratoire Aquacole Calédonien (LAC IFREMER Saint-Vincent) qui ont conduit à la mise au point des plans d'antibioprévention. Après une étude de la sensibilité des flores bactériennes hétérotrophe totale et Vibriionacée aux antibiotiques et une étude d'innocuité sur les larves de crevettes, les essais d'efficacité constituent la validation biologique des projets de protocoles.

La démarche employée au cours de cette étude repose sur l'hypothèse suivante. L'administration d'un antibiotique de substitution doit provoquer une réduction de la flore bactérienne équivalente à celle obtenue avec le traitement de référence à base d'érythromycine.

Première partie

**LA CREVETTE *LITOPENAEUS*
STYLIROSTRIS ET LA FILIÈRE
CREVETTICOLE
DE NOUVELLE-CALÉDONIE**

I - LA PÉNÉICULTURE EN NOUVELLE-CALÉDONIE

Cette présentation de la filière crevette est inspirée d'un poster IFREMER « La filière crevette de Nouvelle-Calédonie en 2002 » et reprend des données du rapport d'activité 2002 du Groupement des Fermes Aquacoles (GFA) [6].

1.1 – Une activité en pleine expansion

- Initiée à l'échelle expérimentale au début des années 70 par la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) puis le CNEXO (Centre National pour l'Exploitation des Océans) et l'IFREMER (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer), l'aquaculture de crevette n'a réellement démarré qu'en 1983 avec la création des fermes SODACAL et AQUAMON et la première fabrication industrielle d'aliments par le provendier SICA. La production était alors entièrement destinée au marché local.
- À partir de 1987 et jusqu'en 1997, les investissements se multiplient avec la mise en place d'un atelier de conditionnement pour l'exportation de crevettes et la création de nouvelles fermes et écloséries.
- En 1998, la filière crevette est une industrie bien établie qui compte :
 - Dix fermes pour un total de 440 hectares et une production annuelle de 1550 tonnes,
 - Deux provendiers (SICA et Moulins de Saint-Vincent) qui fournissent des aliments adaptés aux crevettes,
 - Quatre écloséries qui approvisionnent les fermes en larves,
 - Un atelier de conditionnement, la SOPAC.
- La commercialisation des crevettes à l'exportation reste cependant difficile car le marché mondial est très compétitif. Les principaux pays consommateurs de la crevette calédonienne sont les membres de l'Union Européenne, le Japon et l'Australie.
- De 1999 à 2002, les producteurs, en relation étroite avec l'atelier de la SOPAC s'organisent au sein du Groupement des Fermes Aquacoles (GFA) afin d'optimiser leurs productions et de valoriser la crevette calédonienne à l'exportation. Deux cahiers des charges, Qualicert (signe de qualité « Atout Certifié Qualité ») et Carrefour sont ainsi développés pour mettre en avant une image de marque et de qualité.
- Les bons résultats commerciaux ont attiré les investisseurs et de nouvelles fermes se construisent sur toute la côte Ouest de la Grande Terre. Des projets pour des écloséries et une nouvelle usine de conditionnement sont également en cours.

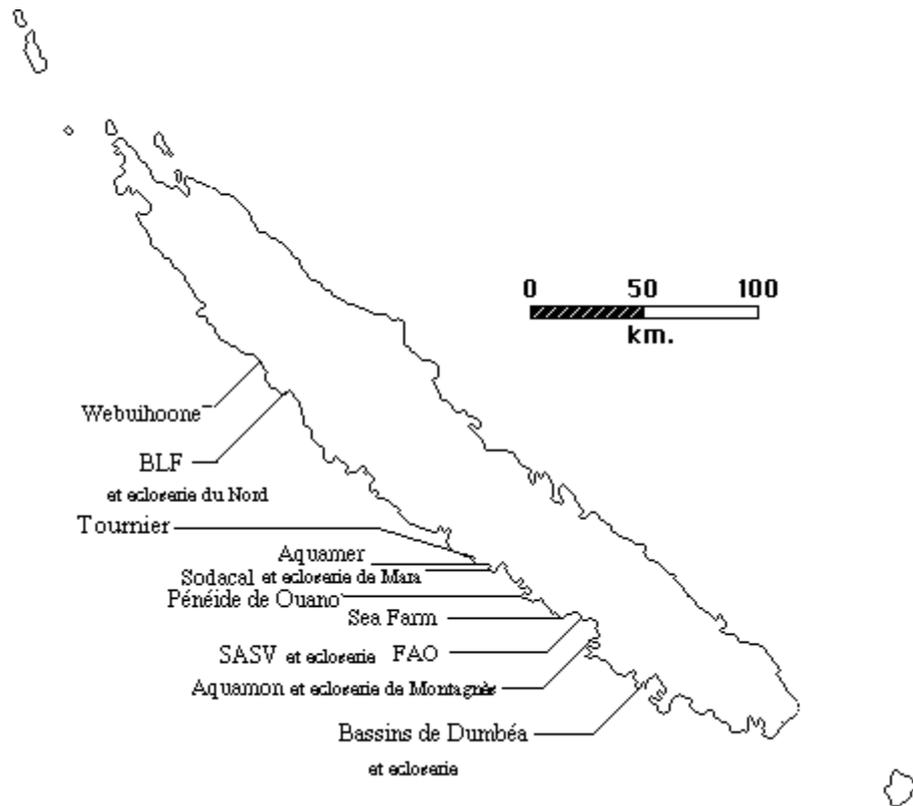


Figure 1 : carte des fermes de production de crevettes (figure issue de la bibliothèque IFREMER)



Photo 1 : bassins de grossissement à la ferme SODACAL

Tableau I : surfaces totales des fermes au cours des quatre dernières campagnes de production en hectares (ha)
(d'après [6])

Filière	Fermes	1998-1999	1999-2000	2000-2001	2001-2002
Export	APRIL				
	AQUAMER	40 ha	40 ha	40 ha	40 ha
	BLF	85 ha	85 ha	85 ha	76 ha
	FAO	8 ha	8 ha	18 ha	18 ha
	OUANO	30 ha	30 ha	30 ha	30 ha
	SEAFARM	34 ha	34 ha	34 ha	34 ha
	SODACAL	130 ha	130 ha	131 ha	132 ha
	STYLIBLEUE				15 ha
	TOURNIER	11 ha	11 ha	11 ha	11 ha
	WEBUIHOONE	42 ha	45 ha	55 ha	55 ha
Mixte	AQUAMON	42 ha	42 ha	42 ha	42 ha
Marché local	Les bassins de DUMBEA (hors GFA)	19 ha	19 ha	19 ha	19 ha
	TOTAL	441 ha	444 ha	465 ha	472 ha

Tableau II : production des fermes par campagne du 1 septembre au 31 août en tonnes (t) (d'après [6])

Fermes	1998-1999	1999-2000	2000-2001	2001-2002
AQUAMER	174 t	225 t	202 t	159 t
BLF	409 t	384 t	395 t	473 t
FAO	33 t	34 t	44 t	77 t
OUANO	162 t	183 t	181 t	138 t
SEAFARM	108 t	92 t	75 t	90 t
SODACAL	483 t	420 t	490 t	329 t
STYLIBLEUE				49 t
TOURNIER	41 t	38 t	43 t	42 t
WEBUIHOONE	191 t	175 t	187 t	288 t
AQUAMON	160 t	147 t	190 t	169 t
Les bassins de DUMBEA (hors GFA)	Estimée à 30 t			
SASV (IFRAMER)	29 t	3 t	0 t	0 t
TOTAL	1820 t	1730 t	1837 t	1844 t

1.2 – L'accompagnement scientifique

- Depuis ses débuts, l'aquaculture de la crevette a bénéficié d'un soutien scientifique pour son développement. Le Laboratoire Aquacole de Calédonie (LAC) situé à Boulouparis dans la baie de Saint-Vincent, est géré par l'IFREMER et son fonctionnement est assuré par des crédits provinciaux.
- Il a évolué en même temps que la filière :
 - Première période : mise au point des techniques d'élevage et choix de l'espèce de crevettes,
 - Deuxième période : transfert au secteur privé et assistance technique aux projets,
 - Troisième période : premiers programmes de recherche en relation avec les mortalités liées au syndrome 93,
 - Quatrième période : définition d'un programme de recherche général du laboratoire pour améliorer les performances des élevages. Différentes disciplines sont abordées (physiologie, nutrition, pathologie, génétique, milieu d'élevage, zootechnie).
- La réhabilitation des infrastructures existantes du LAC permettra de disposer à l'échéance de deux ans de nouvelles installations mieux adaptées aux expérimentations aux analyses et au développement de nouvelles techniques. Une seconde implantation est en construction en Province Nord à Koné ; elle sera plus particulièrement dédiée aux actions d'assistance technique aux aquaculteurs au suivi des techniques employées dans les fermes et écloseries.



Photo 2 : vue aérienne du LAC Saint-Vincent

II - PRÉSENTATION DE L'ESPÈCE

2.1 - Nomenclature et systématique

- Le choix calédonien s'est porté sur la crevette bleue du Pacifique, *Litopenaeus stylirostris*.

Nomenclature scientifique : *Litopenaeus stylirostris*
vernaculaire : Crevette bleue du Pacifique, Pacific Blue shrimp

Systématique : Embranchement : Arthropoda
Super-classe : Crustacea
Classe : Malacostracea
Sous-classe : Eumalacostracea
Super-ordre : Eucarida
Ordre : Decapoda
Famille : Penaeidae
Genre : *Litopenaeus*
Espèce : *Litopenaeus stylirostris*

2.2 - Origine et distribution géographique

- *Litopenaeus stylirostris* est présente à l'état endémique dans l'Est de l'Océan Pacifique, au niveau de l'Amérique Centrale ; on la rencontre surtout sur les côtes mexicaines, mais aussi au Salvador et au Guatemala. Elle est abondamment pêchée au Mexique, élevée de manière extensive à Panama, en semi-intensif à Hawaii et en intensif en Équateur.
- Elle a été introduite en Nouvelle-Calédonie en 1980 avec l'envoi de post-larves issues de parents sauvages de Tucson (USA). Les crevettes élevées en semi-intensif en ce moment en Nouvelle-Calédonie appartiennent environ à la 25^{ème} génération obtenue en captivité.

2.3 - Morphologie

- La famille des Pénéides présente les caractéristiques suivantes :
 - Corps comprimé latéralement,
 - Rostre bien développé possédant huit dents sur son bord dorsal et trois ventralement,
 - Cuticule lisse et légèrement pigmentée en bleu-vert,
 - Absence de chambre incubatrice,
 - Réceptacle séminal ouvert appelé thélycum chez la femelle,
 - Organe copulateur appelé pétasma chez le mâle.
- Il est aisé de différencier les crevettes Pénéides des Caridés. Chez ces dernières, la carapace latérale du second segment abdominal recouvre le premier et le troisième segment, alors que chez les Pénéides, le bord antérieur de chacun des segments est recouvert par la carapace du segment précédent. Par ailleurs, le sixième et dernier segment abdominal est dorsalement caréné.

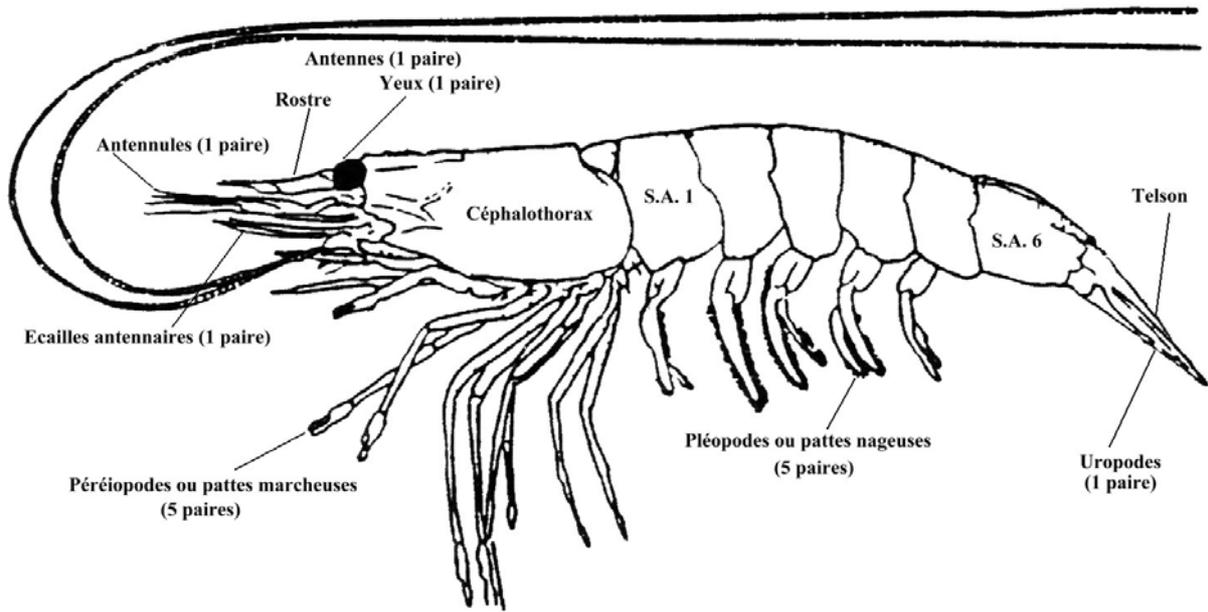


Figure 2 : morphologie externe d'une crevette Pénéide (figure issue de la bibliothèque IFREMER)

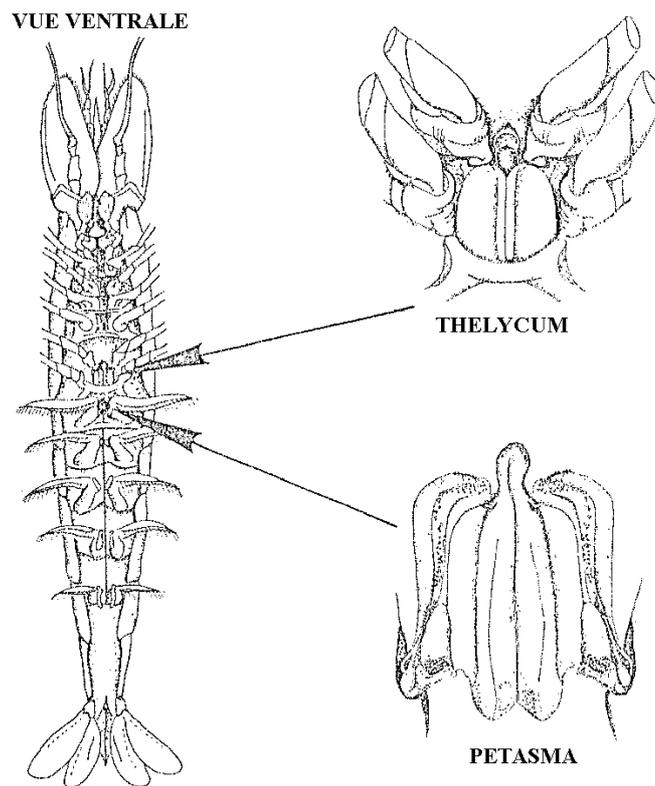


Figure 3 : dimorphisme sexuel chez les crevettes matures (vue ventrale) (d'après [4])

2.4 - Cycle biologique en milieu naturel

- *Litopenaeus stylirostris* vit dans des endroits peu profonds de 0 à -30 mètres, où elle affectionne les fonds vaseux ou sablonneux. Pour autant, elle ne manifeste pas un comportement fouisseur et nage volontiers.

- Les juvéniles vivent plutôt dans les estuaires alors que les adultes préfèrent la pleine mer. Le cycle biologique de l'espèce comprend trois phases :

- La phase méroplanctonique et planctonique qui a lieu sur la côte en eau saumâtre avec les stades larvaires correspondants : Nauplius, Zoé et Mysis,
- La phase benthique qui se passe dans les estuaires avec les post-larves et les juvéniles,
- La phase de migration sexuelle durant laquelle les futurs géniteurs se déplacent vers le large pour se reproduire, puis rejoignent le littoral pour pondre.

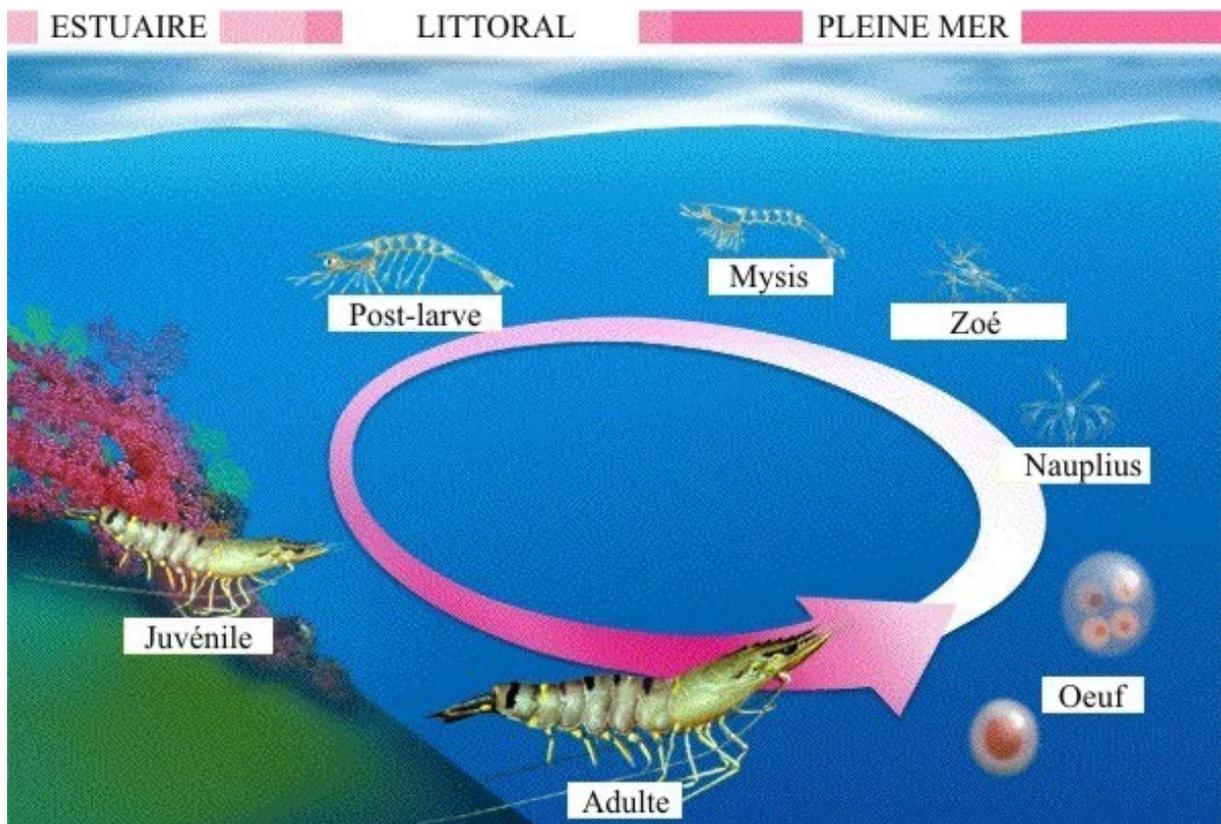


Figure 4 : cycle biologique en milieu naturel (d'après [5])

2.4.1 – Caractères sexuels et reproduction

- La reproduction repose sur un véritable accouplement. Le mâle dépose sur la femelle des spermatophores, capsules cornées plus ou moins ornementées qui contiennent les spermatozoïdes. L'organe copulateur, le pétasma, est constitué de deux rames internes modifiées de la première paire de pléopodes, qui se joignent et guident ainsi les spermatophores vers l'organe reproducteur de la femelle.

- Chez les espèces à thélycum fermé, l'accouplement et la ponte peuvent être séparés de plusieurs mois correspondant à la durée entre deux mues. Cet accouplement doit survenir obligatoirement dans les heures qui suivent une mue de la femelle, lorsque son tégument est encore relativement mou, et cela même si celle-ci est immature et incapable de pondre à cette date.

- Chez les espèces à thélycum ouvert, comme *Litopenaeus stylirostris*, l'accouplement a lieu juste avant la ponte, lorsque la maturité ovarienne est atteinte. Chez cette espèce, la maturation sexuelle des adultes intervient vers huit mois, en étroite relation avec le cycle de mue. La reproduction s'effectue en période chaude, lorsque la température de l'eau avoisine 28 à 29°C.

2.4.3 – Ponte

- Une femelle peut émettre plusieurs centaines de milliers d'œufs par ponte. Elle les abandonne tout de suite après la ponte et ceux-ci se déposent lentement sur le fond. Le développement embryonnaire dure environ dix-huit heures. Les larves écloses passent ensuite par un ensemble de stades avant de devenir des post-larves, à la morphologie très comparable de celle d'une crevette adulte.

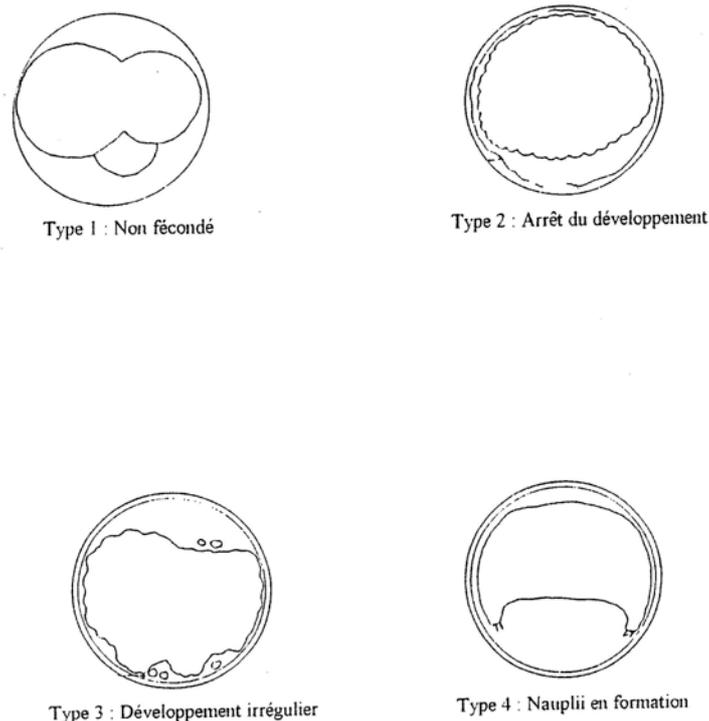


Figure 5 : appréciation de la qualité des œufs(d'après [4])

2.4.4 – Nauplius

- La larve Nauplius est caractérisée par la présence d'un oeil médian et de trois paires d'appendices à fonction natatoire : les antennules, les antennes et les mandibules. Elle est dépourvue de bouche et se nourrit par conséquent des réserves vitellines contenues au départ dans l'œuf. Selon les auteurs, cinq à six stades Nauplius successifs sont décrits, chacun durant entre huit et dix heures. Leur taille moyenne est comprise entre 200 et 250 μm et augmente légèrement au cours des différentes mues.
- Elle présente un photactisme positif très marqué. Cette propriété est utilisée au cours de l'élevage larvaire lors des changements d'eau ou des dénombrements.

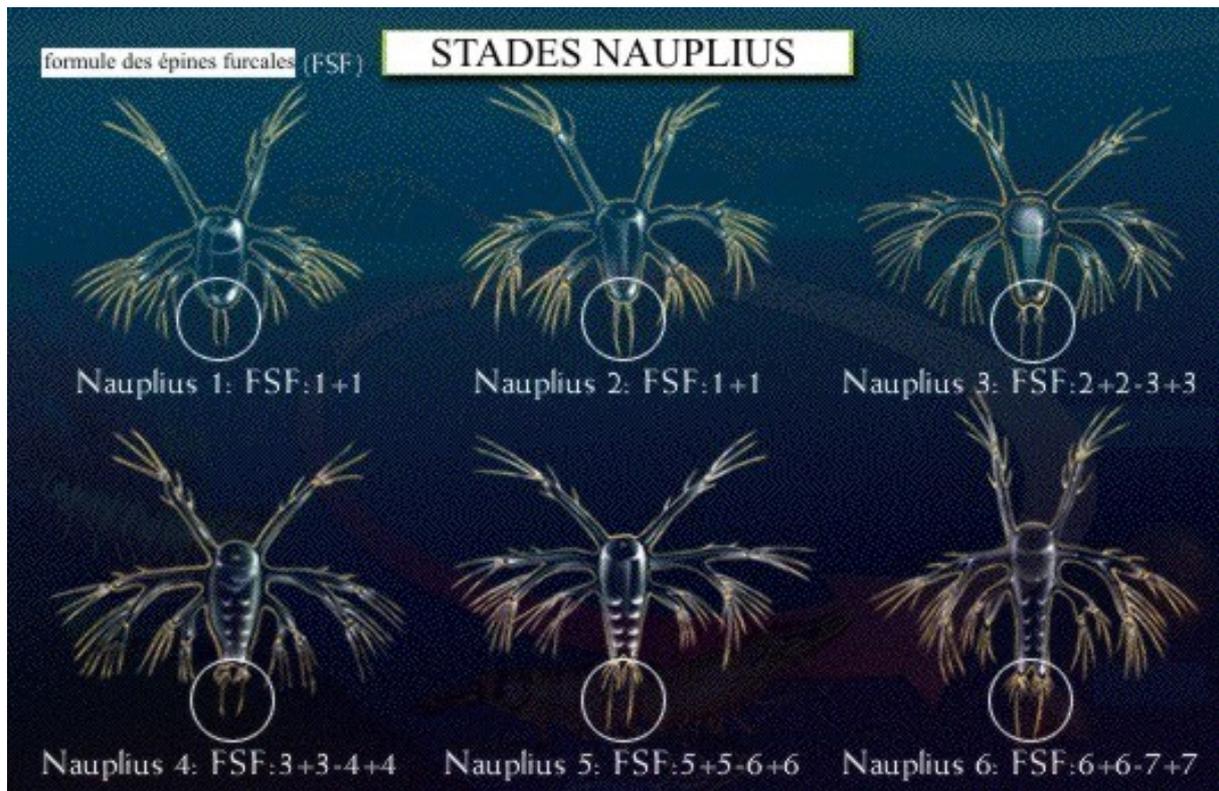


Figure 6 : six stades Nauplius (d'après [5])

2.4.5 - Zoé

- La larve Zoé possède un céphalothorax distinct et un abdomen qui se termine par un telson garni de soies terminales. Elle est pourvue d'un tube digestif fonctionnel et est capable de s'alimenter de micro-algues
- On distingue trois stades Zoé successifs qui durent chacun plus de vingt quatre heures. Le premier, protozoé ou Zoé I, est caractérisé par le fait que les pédoncules oculaires ne sont pas encore apparus. Le second, Zoé II a un rostre et deux yeux pédonculés. Le dernier, Zoé III présente un uropode biramé. Comme chez la larve Nauplius, la taille augmente légèrement au cours des différentes mues.

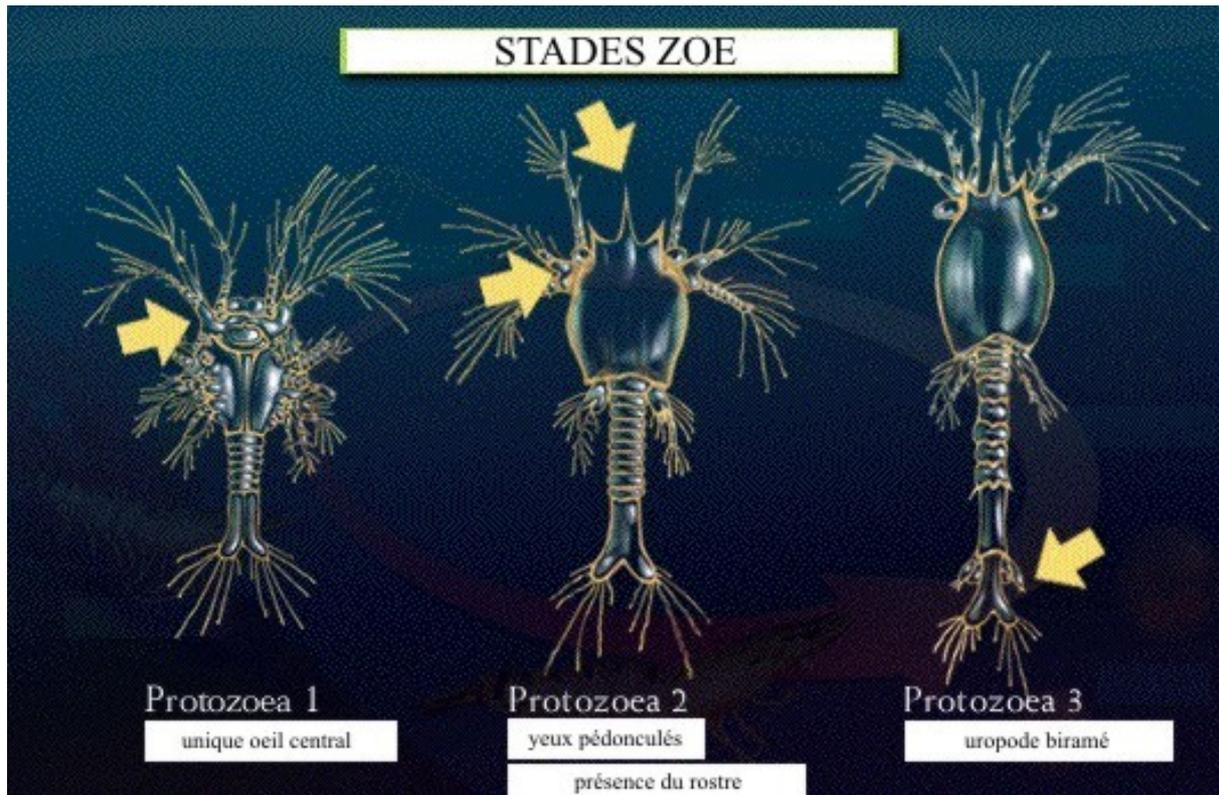


Figure 7 : trois stades Zoé (d'après [5])

2.4.6 - Mysis

- La larve Mysis a grossièrement l'aspect d'une petite crevette mais s'en distingue facilement par la présence de pattes thoraciques natatoires démesurées et dépourvues de pinces, d'un appendice caudal et du rostre.
- Le régime alimentaire est presque exclusivement carnivore. C'est à ce titre que l'on ajoute des larves d'*Artemia salina* dans la séquence alimentaire en élevage larvaire.
- La locomotion de la larve Mysis est très différente de celle des larves Nauplius et Zoé. Alors que ces dernières se déplacent par saccades, se tiennent verticalement dans l'eau avec la tête orientée vers le haut, la larve Mysis se déplace à reculons, la tête en bas avec de temps en temps de brusques mouvements de montée.
- On distingue trois stades Mysis qui diffèrent par la longueur et le développement plus ou moins complet de leurs pattes abdominales. Chaque stade dure plus de vingt quatre heures.
- La taille augmente légèrement au cours des différentes mues.

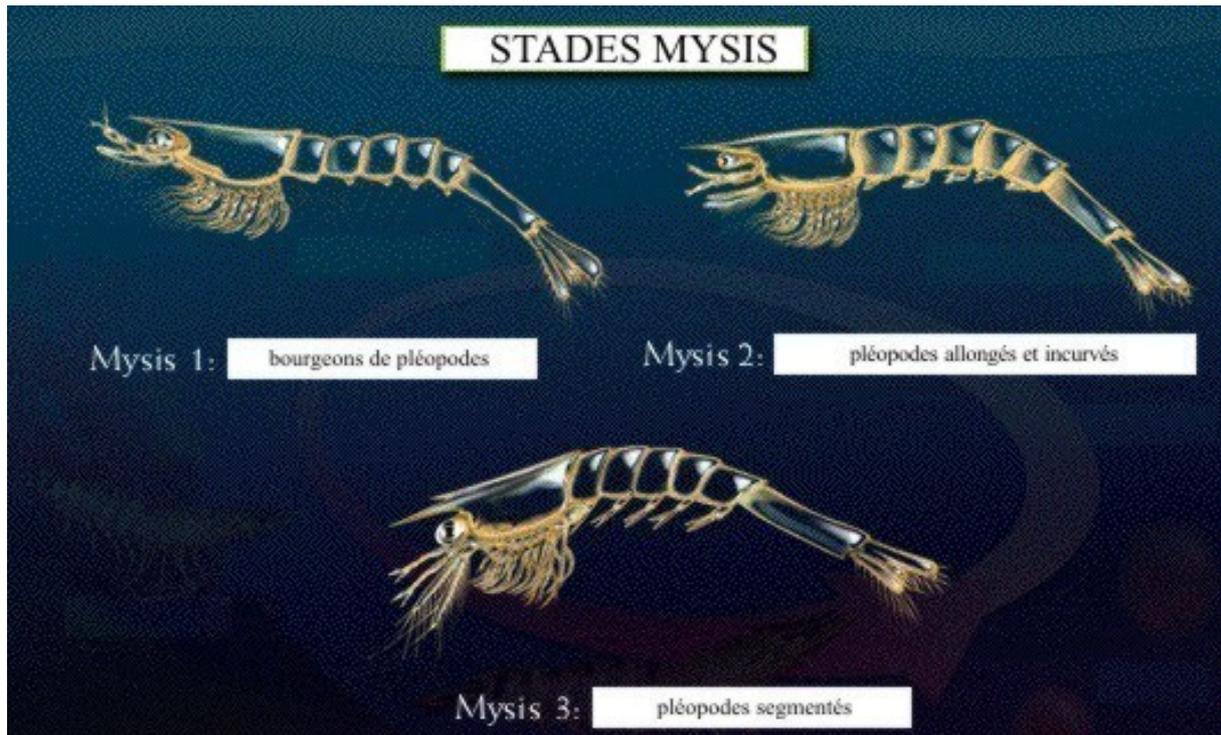


Figure 8 : trois stades Mysis (d'après [5])

2.4.7 - Post-larves

- La ressemblance avec une jeune crevette est encore plus marquée. Le principal caractère qui sépare la larve Mysis de la post-larve (PL) est l'emploi des pléopodes pour la nage chez la post-larve.
- Le régime alimentaire est le même que celui de la larve Mysis, c'est-à-dire presque exclusivement carnivore, seules les quantités de proies changent.
- Le nombre et la disposition des dents ornant le rostre, les sculptures de la carapace céphalothoracique permettent de distinguer les différents stades post-larvaires. En élevage industriel, les stades sont numérotés de un (PL1) à n (PLn), n correspondant au jour où les postlarves sont transférées de la salle d'élevage larvaire à la nurserie.
- Elle mène une vie plutôt pélagique, mais rapidement son comportement se modifie et elle devient benthique. Sa journée se divise en deux phases. Une phase nocturne d'activité (prédation, déplacement et migration, mue) et une phase diurne de repos.



Figure 9 : post-larve (d'après [5])

2.4.8 - Adultes

- La morphologie définitive est atteinte un mois et demi à plus de deux mois après l'éclosion, à l'exception des caractères sexuels secondaires qui se développent au cours de plusieurs mues successives. On peut ainsi reconnaître une phase juvénile avant apparition des organes sexuels secondaires, une phase pré-pubère correspondant à l'apparition puis au développement de ces organes, enfin une phase pubère lorsqu'ils ont atteint la maturité. Thélycum et pétasma sont complètement développés vers l'âge de quatre ou cinq mois. L'activité sexuelle est plus précoce chez les mâles.

- Le développement larvaire achevé et la maturité sexuelle atteinte, la crevette adulte continue de grandir avec une croissance discontinue, étroitement dépendante du phénomène de mue. La mue permet en outre la reproduction, la régénération des appendices et le rejet des parasites externes.

III - LES TECHNIQUES D'ÉLEVAGE

3.1 - Élevage des géniteurs

- L'élevage des géniteurs à la Station de Saint-Vincent est réalisé de manière extensive dans des bassins de 1200 m² et comporte deux phases. Les écloséries privées présentent des bassins de 3000 m² en moyenne. Pour chaque élevage de géniteurs, une fiche synthétique est réalisée ; un modèle est présenté en annexe 1 « La filière crevetticole de Nouvelle-Calédonie ».

3.1.1 - Phase pré-géniteur

- Les post-larves au stade P20-P40 d'un poids moyen de trois à cinq milligrammes sont placées dans les bassins à une densité initiale de un individu par mètre carré. Le sexe-ratio n'est pas contrôlé pour cette première phase.
- L'aliment SICA standard, granulés à 35% de protéines, est distribué ad libitum. La ration est ajustée régulièrement après observation des restes d'aliment non consommé lors des plongées bihebdomadaires ou sur les mangeoires dans les bassins.
- Le renouvellement d'eau journalier est de 15%. La température de l'eau est relevée quotidiennement. Un échantillon d'eau est prélevé une fois par semaine pour suivre la salinité, le pH et l'évolution du bloom phytoplanctonique. À cette occasion, un échantillonnage à l'épervier est réalisé pour contrôler la croissance des individus.
- Après trois à quatre mois d'élevage, les crevettes atteignent un poids moyen de 25 à 30g en fonction de la saison. Le bassin est alors vidangé, les crevettes sont triées et transférées dans un nouveau bassin, où commence la phase géniteur proprement dite.

3.1.2 - Phase géniteur

- Les futurs géniteurs sont triés lors du transfert dans le nouveau bassin, de sorte que la densité à l'ensemencement soit de 0,5 individu par mètre carré et que le sexe-ratio soit de deux mâles pour une femelle.
- L'aliment est distribué ad libitum selon une séquence hebdomadaire bien précise. Les crevettes reçoivent des granulés MSV « géniteurs » à 40-45% de protéines durant cinq jours. Puis un jour de jeûne est observé et le lendemain de l'aliment frais, calmar et/ou moule, est distribué. À cet âge, les crevettes se nourrissent surtout de l'aliment artificiel. Le bloom phytoplanctonique participe avant tout au confort général des animaux. Par la diminution de l'intensité lumineuse dans l'eau des bassins, le stress lié aux déplacements des employés sur les digues des bassins reste limité.
- Le renouvellement d'eau et les contrôles des paramètres du milieu sont réalisés de façon identique à la phase pré-géniteur.
- Après trois à quatre mois d'élevage, les bassins sont totalement vidangés et les crevettes de six à neuf mois, pesant 50 g minimum, sont sexées et réparties dans les bacs de la « zone maturation ».



Photo 3 : bassins d'élevage des géniteurs du LAC Saint-Vincent



Photo 4 : spécimen géniteur de *Litopenaeus stylirostris*

3.2 - Reproduction assistée

- La reproduction repose sur la réalisation d'une véritable fécondation artificielle, qui a été mise au point par l'IFREMER.

3.2.1 - Maturation des géniteurs

- Les bacs de la « zone maturation » sont remplis en eau de mer filtrée à 50 µm, trois jours avant l'entrée en maturation des géniteurs.

- Les mâles sont placés à l'extérieur dans des bacs rectangulaires en béton, de cinq m³ à la charge maximale de 500 g/m². Le renouvellement journalier d'eau est de 100% et l'eau est à température ambiante. Les femelles sont réparties dans des bacs cylindriques de 7,5 m³, à fond de sable à la charge maximale de 450 g/m².

- Le filtre sous sable facilite l'observation des femelles matures et participe à la circulation de l'eau chauffée. Le contrôle de la photopériode, inversée par rapport au jour naturel avec 10 heures d'obscurité et 14 heures de lumière, permet une meilleure organisation du travail. Les pontes ayant lieu trois à quatre heures après la tombée de la nuit, la lumière artificielle (néons) est maintenue de 21 heures à 11 heures de sorte que les inséminations artificielles soient effectuées en début d'après-midi. Deux jours après le transfert, la température est augmentée progressivement de deux degrés Celsius par jour pour atteindre au finale 29°C. Pour maintenir l'eau à cette température le renouvellement journalier d'eau n'est que de 50%. Une fiche de suivi journalier des géniteurs en zone de maturation est présentée dans l'annexe 1 « La filière crevetticole de Nouvelle-Calédonie ».



Photo 5 : salle de maturation des géniteurs femelles à l'écloserie de Mara

3.2.2 - Épédonculation

- Après une phase d'adaptation de quatre jours, les femelles sont pêchées individuellement à l'épuisette pour être épédonculées. L'intervention consiste à appliquer une ligature à la base d'un des deux pédoncules oculaires.
- Elle a pour effet de lever l'inhibition du développement de l'ovaire causée par une hormone accumulée dans la glande endocrine (ou organe X) de chaque pédoncule oculaire. Il est remarquable de constater que l'ablation unilatérale ne s'accompagne pas d'un phénomène de compensation par l'organe X qui subsiste.
- Cette technique « physique » originale permet avant tout une synchronisation des cycles sexuels de toutes les femelles présentes dans la zone de maturation. Les femelles sont généralement prêtes à être fécondées deux à trois jours après. L'ablation a aussi pour effet d'augmenter la fréquence des maturations ovariennes. On peut ainsi obtenir un indice de ponte de trois à quatre, c'est-à-dire trois à quatre pontes par mois au lieu d'une.



Photo 6 : technique d'épédonculation d'un géniteur

3.3.3 - Détermination des stades de maturité sexuelle

- Les mâles sont pêchés individuellement à l'épuisette. En plaçant le mâle de profil, il est possible d'observer par transparence la taille des spermatophores. Le manipulateur recherche les mâles présentant des ampoules terminales renflées contenant un spermatophore blanc.
- Les femelles sont observées en évolution dans le bac de maturation, à l'aide d'une lampe de forte puissance. Le substrat en sable des bacs facilite cette observation. En fonction de l'étendue de l'ovaire de couleur orange à brune, la femelle est jugée prête ou non à la fécondation.

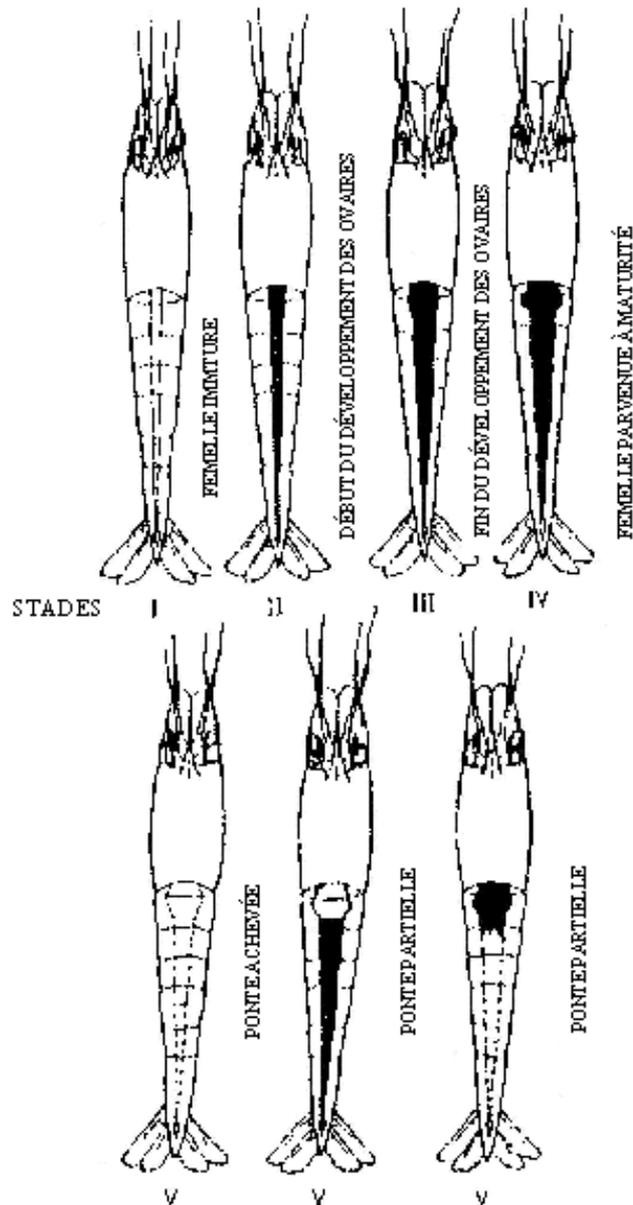


Figure 10 : différents stades de maturité sexuelle chez la femelle (d'après [4]).



Photo 7 : coloration orange et grande taille des ovaires chez la femelle mature

3.2.4 - Insémination artificielle

- L'insémination artificielle est réalisable chez les espèces à thélycum ouvert, quelques heures avant la ponte.
- L'extraction des deux spermatophores est obtenue par simple pression dorso-ventrale des ampoules terminales.
- Le sperme issu des spermatophores de deux mâles est mélangé dans un verre de montre puis posé sur le réceptacle de la femelle, juste au-dessus du thélycum au niveau de l'avant dernière paire de péréiopodes.



Photo 8 : prélèvement des spermatophores chez le mâle

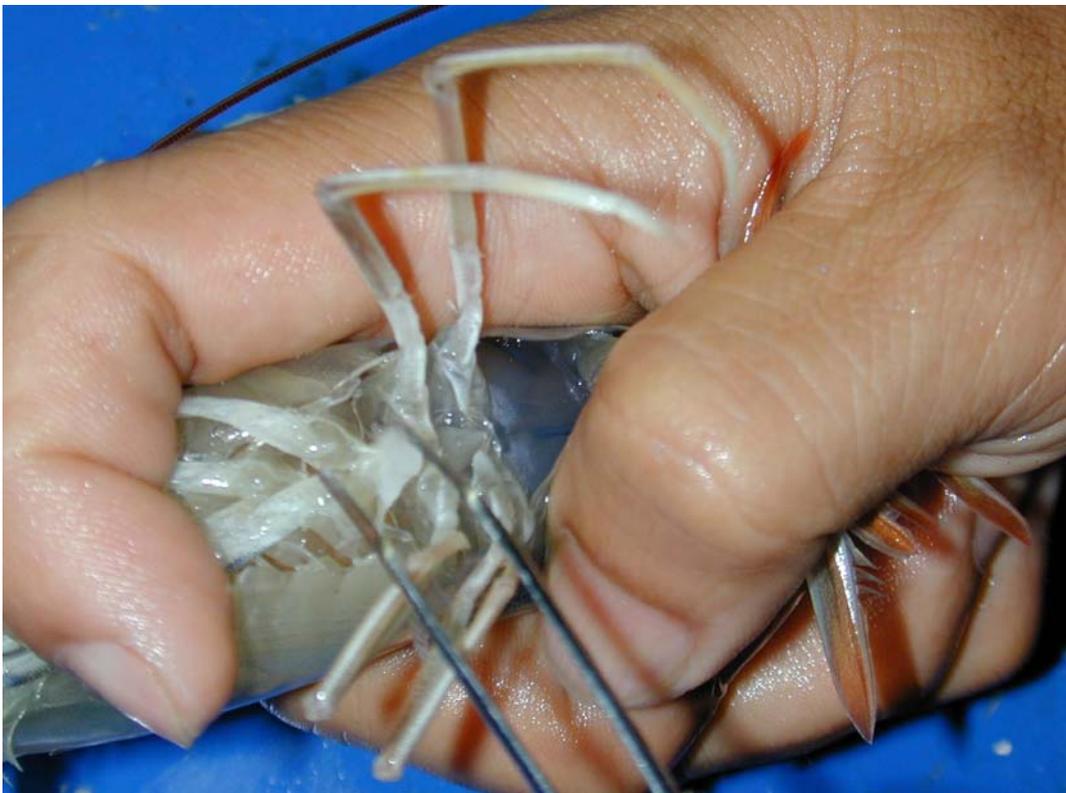


Photo 9 : dépôt du sperme au-dessus du thélycum au niveau de l'avant dernière paire de péréiopodes

3.2.5 - Ponte

- Les femelles sont placées dans des pondoirs individuels de quinze litres sans bullage, à l'obscurité. La ponte a lieu la nuit quelques heures après la fécondation. Selon la taille de la femelle, 100 000 à 400 000 œufs sont émis qui tombent ensuite lentement sur le fond du pondoir. Les femelles sont alors retirées et l'aération rétablie.



Photo 10 : pondoirs individuels cylindro-coniques et récupération de la ponte

3.2.6 - Récupération des pontes

- Le lendemain, la totalité de la ponte est recueillie : œufs non fécondés, œufs fécondés mais non éclos appelés « bons œufs », coquilles et larves nauplii. Une moyenne sur deux comptages volumétriques permet de déterminer les taux de fécondation et d'éclosion.

$$\text{Taux de Fécondation} = (\text{bons œufs} + \text{nauplii}) / (\text{total œufs} + \text{nauplii})$$

$$\text{Taux d'éclosion} = \text{nauplii} / (\text{nauplii} + \text{bons œufs})$$

- L'ensemble est ensuite déversé dans un éclosoir qui remplit la fonction de décanteur. Les nauplii sont recueillies par surverse, en faisant appel au phototropisme positif des nauplii. Une moyenne sur trois comptages volumétriques est réalisée pour déterminer le nombre exact de nauplii.
- Une fiche récapitulative regroupant les résultats des pontes est rédigée à chaque production.



Photo 11 : éclosoir et phototropisme des larves

3.3 - Élevage larvaire

- La salle d'élevage larvaire dispose d'une réserve de 80 m³, remplie trois jours avant les premières pontes. L'utilisation en circuit fermé préserve l'écloserie des variations de qualité d'eau et garantit un bon fonctionnement des installations y compris lors de pollutions ou de coupures d'eau qui surviennent pendant les cyclones. Le système de filtration comprend un filtre à sable de 50 µm et un filtre à cartouche de 5 µm. L'eau est additionnée de 5 g/m³ d'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA) qui chélate les ions divalents, néfastes aux premiers stades de l'élevage. L'eau est chauffée en premier lieu par un système de résistances.
- Le protocole d'élevage larvaire est décrit en annexe 1 « La filière crevetteicole de Nouvelle-Calédonie ».

3.3.1 - Préparation des bacs

- L'élevage est mené dans des bacs cylindro-coniques d'un volume de 2 ou de 5 m³ à Saint-Vincent et de 10m³ dans les écloseries privées.
- Les bacs sont soigneusement frottés au savon de Marseille, rincés à l'eau douce puis remplis avec de l'eau de mer de la réserve filtrée à 5 µm. La température de l'eau est maintenue à 29°C par des résistances chauffantes individuelles. Un léger bullage est installé. Après cette préparation, 120 à 150 nauplii par litre sont transférées et l'élevage larvaire débute (J0).



Photo 12 : salle d'élevage larvaire au LAC Saint-Vincent

3.3.2 – Séquence alimentaire

- La distribution d'aliment débute à J1 avec des micro-particules de la gamme Bernaqua®. Une première dose de 1 g/m³ de Royal Caviar 5-50 est distribuée à 20 heures pour les nauplii qui évolueraient en larves Zoé au cours de la nuit. La ration est diluée avec de l'eau dans un bécher puis répartie dans les bacs. Les micro-particules sont distribuées de Zoé I à Zoé II (Royal Caviar 5-50 à 1 g/m³), de Zoé III à Mysis III (Golden Pearls 50-100 à 0,5 g/m³), de P1 à P3 (Golden Pearls 100-200 à 0,5 g/m³), de P4 à P7 (Golden Pearls 200-300 à 1 à 2 g/m³) et de P8 jusqu'au transfert en nurserie (Golden Pearls 300-500 à 2 g/m³). À partir de Zoé III, des distributions fractionnées d'*Artemia salina* complètent la ration de micro-particules.
- Il est important de noter qu'à Z1 et Z3, le bullage est augmenté pour éviter l'encrassement des soies des animaux qui pourraient leur être fatal.

3.3.3 - Traitements

- L'antifongique TREFLAN ND (Trifluraline) est ajouté de manière préventive aux doses de 40 mL/m³ dès la préparation des bacs, puis de 100 mL/m³ à chaque changement d'eau. Un plan d'antibioprévention employant l'érythromycine pure est appliqué de J3 à J9 compris.

3.3.4 - Changements d'eau

- De J0 à J9, aucun changement d'eau n'est réalisé. À partir de J9, les renouvellements s'opèrent régulièrement.

3.3.5 - Vérification de la formule rostrale avant le transfert en nurserie

- À la sortie de l'écloserie, la formule rostrale est vérifiée. La presque totalité des animaux doit présenter une formule supérieure ou égale à [3-0], trois dents sur le dessus et aucune sur le dessous du rostre.
- Les post-larves sont filtrées sur des tamis de maille de 500 µm, puis concentrées dans de grandes poubelles de 80 L munies d'une aération. Au minimum, cinq comptages volumétriques de 135 mL sont réalisés après un fort brassage du volume d'eau. Une fois le nombre de post-larves connu, les animaux sont dirigés vers la nurserie.

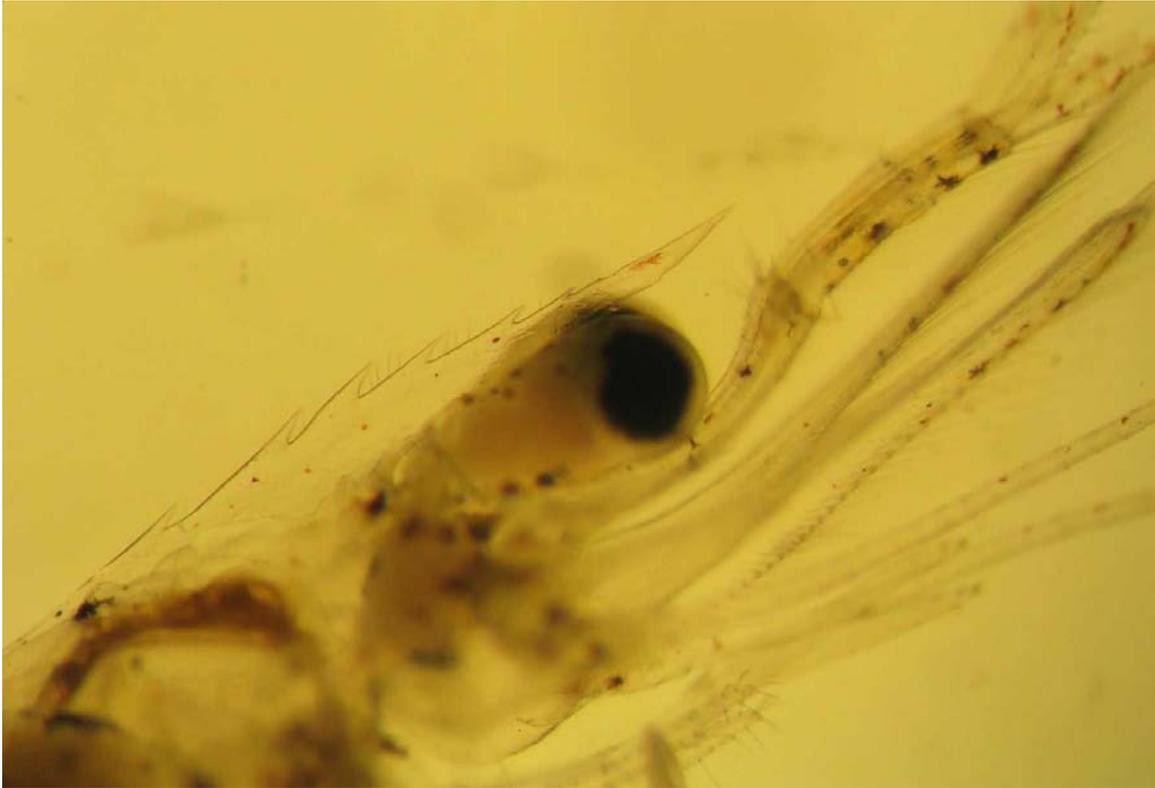


Photo 13 : dents disposées sur le rostre (formule rostrale)

3.3.6 - *Vide sanitaire*

- Une fois les post-larves transférées en nurserie, les bacs sont frottés au savon de Marseille, rincés à l'eau douce, puis remplis avec de l'eau douce additionnée de chlore. La réserve est ensuite vidée puis chlorée ainsi que l'ensemble du circuit de l'écloserie. Au bout de deux jours, l'ensemble est vidé, rincé à nouveau à l'eau douce. Un assec de deux semaines est observé avant toute nouvelle rentrée d'animaux.

3.4 – Nurserie

- La nurserie a pour objet d'acclimater progressivement les post-larves aux conditions de température, de pH, de salinité et de luminosité des bassins de production. Un transfert direct occasionne un stress qui peut être à l'origine d'une mortalité de près de 70%.
- La phase d'acclimatation est réalisée dans des "raceways" de 10m³ ou des "moulinettes" de 100 m³ situés à l'extérieur. La nurserie doit être recouverte sur au moins 30% de sa surface d'une toile ombragée pour créer des zones de faible luminosité. Elle est remplie d'eau de mer filtrée à 50µm et le renouvellement journalier d'eau est de 50%. L'alimentation s'appuie sur la distribution d'*Artemia salina* à raison de 450 grammes pour un million de post-larves et de micro-particules Golden Pearls 300-500. En ce qui concerne le suivi d'élevage, une plongée quotidienne est réalisée afin de ramasser d'éventuelles mortes et observer les restes d'aliments pour réajuster la ration.



Photo 14 : « moulinette » du LAC Saint-Vincent

- Cette phase dure une à deux semaines, les post-larves étant menées jusqu'à l'âge de P₁₅ en saison chaude et de P₂₀ en saison froide. À la sortie de la nurserie, la formule rostrale est vérifiée et un minimum de 50% d'animaux présentant une formule rostrale de [5-0] est requis.
- La pêche de la moulinette est effectuée tôt le matin pour éviter des températures et une luminosité trop élevées. Les animaux sont filtrés sur des tamis de maille de 500 à 700 µm, puis concentrés dans des poubelles de 80 L pour être comptés de la même façon qu'à la sortie de l'écloserie. Les animaux sont ensuite stockés transitoirement dans une cuve de transport de 1m³ munie d'une forte aération et d'une forte concentration en *Artemia salina*.
- Afin de réaliser l'ensemencement du bassin grossissement dans des conditions optimales, la température et la salinité sont mesurées. S'il existe de grosses différences entre les deux milieux, de l'eau du bassin est progressivement mélangée à l'eau de la cuve. Les juvéniles sont ensuite introduits dans la partie la plus profonde du bassin de production.

Deuxième partie

**PRÉSENTATION
DES ANTIBIOTIQUES
DE SUBSTITUTION À
L'ERYTHROMYCINE**

I - LE CHOIX DES ANTIBIOTIQUES DE SUBSTITUTION

1.1- Origine de l'emploi des antibiotiques en élevage larvaire de crevettes :

- Il n'est pas question d'employer une substance pharmacologiquement active telle qu'un antibiotique sans une justification réelle. Schématiquement, on peut distinguer deux circonstances d'utilisation :

- le traitement d'une bactériose, lorsqu'elle a été diagnostiquée et que le ou les agents responsables ont été identifiés,
- la prophylaxie (antibioprévention), quand on veut prévenir une infection avant son apparition. Cela suppose que l'on ait parfaitement décrit le phénomène morbide au préalable (pathogénie) et que l'on connaisse les situations à risque susceptibles de provoquer son apparition (épidémiologie).

- Les difficultés rencontrées dans les élevages larvaires de crevettes ont été énoncées à multiples reprises dans des publications, sans pour autant être très bien décrites sur le plan clinique. Certains scientifiques suggèrent l'implication de bactéries de la famille des Vibrionacées dans les épisodes de mortalité observés. Les différentes espèces suspectées et / ou identifiées sont *Vibrio harveyi*, de loin le plus fréquent, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. splendidus* [11] [12]. Par ailleurs, l'ajout de nauplii d'*Artemia salina* dans le régime alimentaire des larves de crevettes à partir de J5 est à l'origine de l'introduction de germes dans le milieu d'élevage ([10] [17], Goarant et Pham, com. pers.).

- En Nouvelle-Calédonie, les aquaculteurs sont confrontés à une augmentation de la mortalité larvaire pouvant même atteindre 100%, avec un retard voire une interruption dans le passage des stades. L'emploi des antibiotiques s'est généralisé depuis de nombreuses années et aucune donnée récente sur un élevage sans antibiotique avec une nouvelle zootechnie n'est disponible. Au cours de ce stage, des essais d'élevage larvaire sans antibiotique ont été menés dans différents volumes, qui ont confirmé les observations des aquaculteurs (essais en volumes d'1 L dans la partie "Innocuité et détermination des CL50", de 150 L et 2 m³ dans la partie "Efficacité").

- En l'état actuel de nos connaissances et afin répondre à la demande des professionnels du GFA, il a été décidé de tester de nouveaux antibiotiques pour faire face à des problèmes d'antibio-résistance. On pourra, à défaut, utiliser le terme d'antibioprévention pour qualifier l'emploi des antibiotiques de substitution. On trouvera dans l'annexe 2 l'inventaire des antibiotiques déjà employés en éclosion de crevettes dans le monde.

1.2 – Critères de sélection du principe actif :

Le choix des molécules actives repose sur quatre principaux critères.

1.2.1 – Activité antibactérienne

En l'absence de certitude sur l'agent causal et sur l'implication de germes de surinfection, le spectre antibactérien doit être le plus large possible, avec une action sur les bactéries à Gram positif et négatif. Il englobe de fait la famille des Vibrionacées.

1.2.2 - Innocuité pour les larves de crevettes et pour l'environnement

Aucun effet toxique ne doit survenir chez les larves de crevettes aux posologies usuelles. En matière d'impact sur l'environnement, il convient de rappeler l'importance d'un système efficace de traitement des rejets en fin d'élevage larvaire (système de chloration - déchloration ou équivalent). Seigne (2001) a démontré son utilité dans le traitement des effluents d'élevage contenant de l'érythromycine [23].

1.2.3 - Développement de résistances

Les molécules actives doivent présenter un risque de développement aussi faible et lent que possible des phénomènes de résistance, afin de pérenniser leur emploi en élevage larvaire.

1.2.4 - Respect de la réglementation française et communautaire

• « Les substances présentant des propriétés anti-infectieuses ne peuvent être délivrées en l'état aux éleveurs ou groupements agricoles..., ou détenus ou possédés par ces éleveurs ou groupements. » (Code de la Santé Publique, articles L.5146 à L5153-1).

Cela signifie concrètement que l'on évitera l'emploi d'antibiotiques purs dans les protocoles d'antibioprévention. La forme définitive d'emploi des antibiotiques de substitution doit être soit une spécialité pharmaceutique vétérinaire, soit une spécialité pharmaceutique humaine soit une préparation magistrale, en respect de l'article L.5143-4 du CSP « **La cascade** » :

« Le vétérinaire doit prescrire en priorité un médicament vétérinaire autorisé pour l'animal de l'espèce considérée et pour l'indication thérapeutique visée ou un aliment médicamenteux fabriqué à partir d'un prémélange médicamenteux autorisé répondant aux mêmes conditions. Dans le cas où aucun médicament vétérinaire approprié bénéficiant d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), d'une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) ou d'un enregistrement n'est disponible, le vétérinaire peut prescrire :

1° Un médicament vétérinaire autorisé pour des animaux d'une autre espèce dans la même indication thérapeutique, ou pour des animaux de la même espèce dans une indication thérapeutique différente ou un aliment médicamenteux fabriqué à partir d'un prémélange médicamenteux autorisé répondant aux mêmes conditions ; [hors RCP]

2° Si le médicament mentionné au 1° n'existe pas, un médicament vétérinaire autorisé pour des animaux d'une autre espèce dans une indication thérapeutique différente ou un aliment médicamenteux autorisé répondant aux mêmes conditions ; [hors RCP]

3° Si les médicaments mentionnés aux 1° et 2° n'existent pas, un médicament autorisé pour l'usage humain ;

4° À défaut des médicaments mentionnés aux 1°, 2° et 3°, une préparation magistrale vétérinaire... »

En l'absence de spécialité pharmaceutique vétérinaire dédiée à l'élevage de crevettes et en l'absence de certitude sur l'agent causal, on se placera prioritairement au niveau 2 de « la cascade ».

- Il convient de préciser qu'il s'agit de la réglementation française et européenne. Jocelyn MEROT du Service d'Inspection Vétérinaire Alimentaire et Phytosanitaire de Nouvelle – Calédonie (SIVAP) m'a éclairé sur les grandes lignes de la réglementation calédonienne concernant l'utilisation des antibiotiques en productions animales. Il apparaît que la réglementation est en cours d'élaboration. On peut s'attendre à ce qu'elle soit inspirée de celle de la métropole, mais ceci n'est qu'une hypothèse. Consulter les gens du SIVAP est, me semble-t-il, la meilleure solution pour avoir ce supplément important d'informations.

1.3 – Critères de sélection de la spécialité pharmaceutique vétérinaire :

- Un pré-mélange médicamenteux est inadapté à un usage en écloserie. Premièrement, le pré-mélange n'est pas utilisable tel quel. La réglementation impose l'incorporation du pré-mélange à un aliment avant sa distribution aux animaux. Il aurait donc fallu mettre au point une technique pour intégrer l'antibiotique aux différentes micro-particules ou aux nauplii d'*Artemia salina*. Deuxièmement, la préparation extemporanée d'aliment médicamenteux par un utilisateur ne peut s'effectuer que sous l'autorité d'un pharmacien ou d'un vétérinaire et nécessite un agrément de l'utilisateur.

- Le choix se porte d'emblée sur une spécialité pharmaceutique, que l'on utilise directement dans l'eau d'élevage. Pour une application en élevage larvaire, elle doit présenter certaines caractéristiques.

1.3.1 - Teneur en principe actif

La spécialité pharmaceutique vétérinaire étant destinée à être mélangée à l'eau d'élevage, il est important que le volume de médicament, principe actif et excipient associé, soit raisonnable pour ne pas entraver le bon déroulement de l'élevage. On utilisera des spécialités à 50% d'antibiotique.

1.3.2 - Absence d'effet adverse des excipients

- La nature de l'excipient est décrite dans le R.C.P. (Résumé des Caractéristiques du Produit) figurant dans le dossier d'A.M.M. (Autorisation de Mise sur le Marché). Le R.C.P. est un « enjeu stratégique » pour le laboratoire pharmaceutique et à ce titre, il est difficile voire impossible d'y avoir accès.

- Une spécialité pharmaceutique vétérinaire est généralement conçue pour certaines espèces, pour des indications précises d'emploi avec des modes d'administration bien définis. Les propriétés que procurent les excipients sont très diverses (citons par exemple une stabilité accrue, un effet retard...). Au sein des excipients, ce qui peut être sans danger pour les espèces cibles ne l'est pas forcément pour des larves de crevettes. L'absence de spécialité consacrée à la crevette, nous oblige à tester différentes formes commerciales destinées normalement à d'autres espèces animales, en respect de la « cascade ».

Dans le cadre d'un stage à l'IFREMER, Massi (1998) a soulevé l'idée que la présence de lactose comme excipient pourrait expliquer la mauvaise efficacité de l'Inoxyl ND (acide oxolinique), le lactose constituant un bon substrat pour le développement de *Vibrio spp.* [17].

- En l'absence de données précises sur les excipients, le choix de la bonne spécialité s'avère donc difficile. Les essais d'innocuité et d'efficacité sont donc l'occasion d'évaluer à la fois les propriétés du principe actif et celles des excipients.

1.3.3 - Forme galénique appropriée et disponibilité en grand conditionnement

Les spécialités possédant une teneur suffisante en principe actif se présentent sous deux formes principalement. Il s'agit soit de formes injectables, soit de poudres orales hydrosolubles.

Au premier abord originale, l'idée d'utiliser une forme injectable (Tribrissen injectable ND) en balnéation directement dans l'eau a été appliquée par Merlaut (2001) dans un précédent travail sur ce sujet avec des résultats encourageants [18]. Des essais supplémentaires ont donc été menés à l'occasion de cette étude pour valider ces résultats. Néanmoins, le conditionnement en petits flacons et le prix des spécialités injectables font que de telles formes pharmaceutiques ne seront pas retenues pour une utilisation industrielle.

Le choix se porte donc sur des poudres orales hydrosolubles, disponibles en boîtes de 5 kg.

1.3.4 - Coût raisonnable

À propriétés égales, la spécialité pharmaceutique vétérinaire au plus faible coût est finalement sélectionnée.

II - L'OXYTÉTRACYCLINE

L'oxytétracycline est un antibactérien naturel de la famille des tétracyclines, produit par un champignon *Streptomyces rimosus*. Son activité bactériostatique à spectre large s'exerce sur les bactéries à Gram négatif et positif.

2.1 - Pharmacie chimique :

2.1.1 - Structure

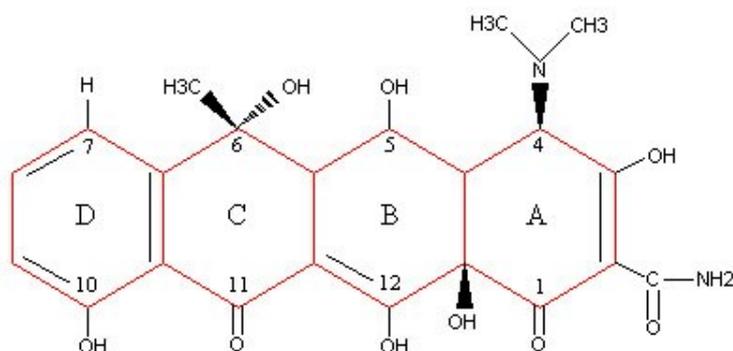
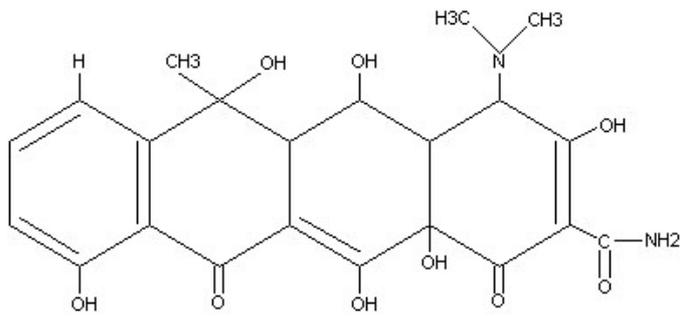


Figure 1 : structure de l'oxytétracycline

Toutes les tétracyclines ont en commun le même squelette tétracyclique, le noyau naphtacène, qui résulte de la condensation de quatre cycles insaturés à six chaînons.

2.1.2 - Propriétés physiques

- L'oxytétracycline se présente comme une poudre cristalline jaune, de masse molaire 460,4 et de point de fusion de 182°C.
- La présence de plusieurs systèmes de doubles liaisons conjuguées explique l'absorption de cette molécule dans l'ultraviolet ($\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm}$ dans la soude à 0,1 mol/L). Ces doubles liaisons lui confèrent également une fluorescence dans le proche ultraviolet (excitation 430 nm, émission 503 nm dans un mélange d'acétonitrile et d'acide perchlorique 0,02 mol/L, (24 : 76, volume pour volume)). La présence de plusieurs carbones asymétriques lui procure une action sur la lumière polarisée. Le pouvoir rotatoire spécifique de l'oxytétracycline est de -196° dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L.
- Sous sa forme non ionisée, elle est peu soluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques ($K_{ow} = 0,03$). Sous sa forme ionisée, elle est soluble dans l'eau et les alcools mais insoluble dans les solvants organiques.

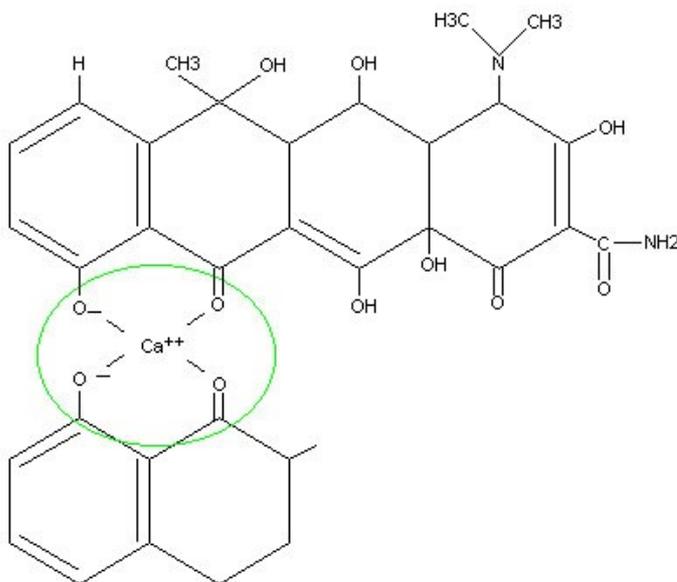


<p><u>Conséquence galénique :</u> solutions organiques (forme non ionisée)</p> <p><u>Conséquence pharmacocinétique :</u> diffusion transmembranaire</p>

Figure 2 : solubilité de l'oxytétracycline

2.1.3 - Propriétés chimiques

• L'oxytétracycline est capable de se chélater avec de nombreux cations divalents ou trivalents : Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} . L'enchaînement β -dicétophénolique en positions 11 et 12, ainsi que le groupe carboxamide en position 2 du cycle A expliquent ces propriétés chélatrices.



<p><u>Conséquence pharmacocinétique :</u> résorption orale diminuée par Ca^{++} (en milieu marin)</p> <p><u>Conséquence pharmacodynamique :</u> pénétration intrabactérienne, fixation sur l'ARN ribosomal</p>
--

Figure 3 : chélation de l'oxytétracycline

L'ajout d'EDTA dans l'eau d'élevage est à ce titre intéressant car il fixe en partie les ions susceptibles d'inactiver l'oxytétracycline. [1] [15]

• L'oxytétracycline manifeste un caractère amphotère à prédominance basique. La présence d'un groupement diméthylamine (amine tertiaire) est à l'origine du caractère basique de cette molécule, les fonctions cétones et alcools induisent quant à elles une acidité faible. La salification de la fonction amine tertiaire permet la préparation de sels tels que les chlorures hydrosolubles, sels qui seront utilisés dans le nouveau protocole d'antibio-prévention. Les solutions de ces sels sont acides, facilement hydrolysables et instables.

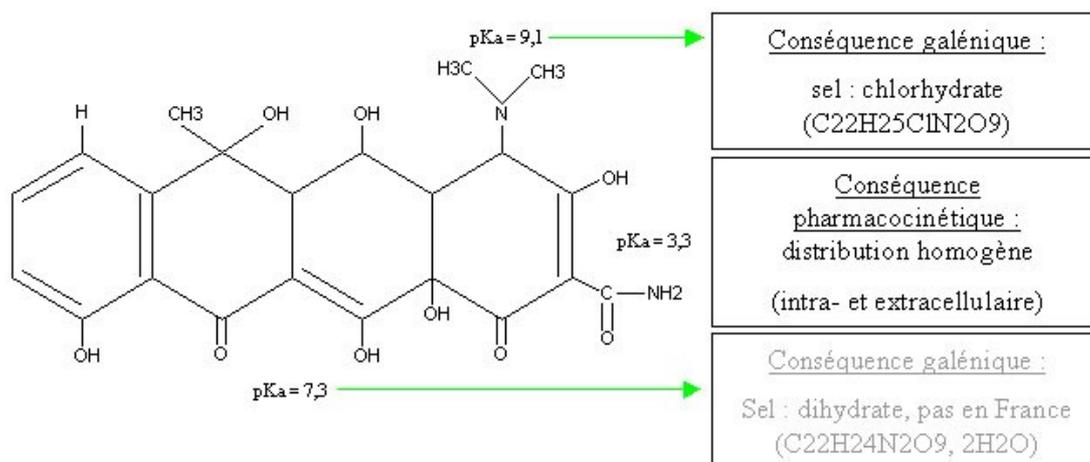


Figure 4 : caractère amphotère à prédominance basique de l'oxytétracycline

• L'oxytétracycline est susceptible de subir une dégradation rapide en solution aqueuse. Elle peut donner naissance à la 4-épi-oxytétracycline lors d'une réaction d'épimérisation et à de l'anhydro-oxytétracycline instable puis de l' α - et β -apo-oxytétracycline lors d'une déshydratation en milieu acide. Ces dégradations sont d'autant plus rapides que la température est plus élevée et la lumière naturelle ou artificielle est plus intense. Une étude a montré que l'oxytétracycline est dégradée rapidement dans l'eau de mer sous lumière naturelle, la cinétique de dégradation n'étant cependant pas étudiée [14].

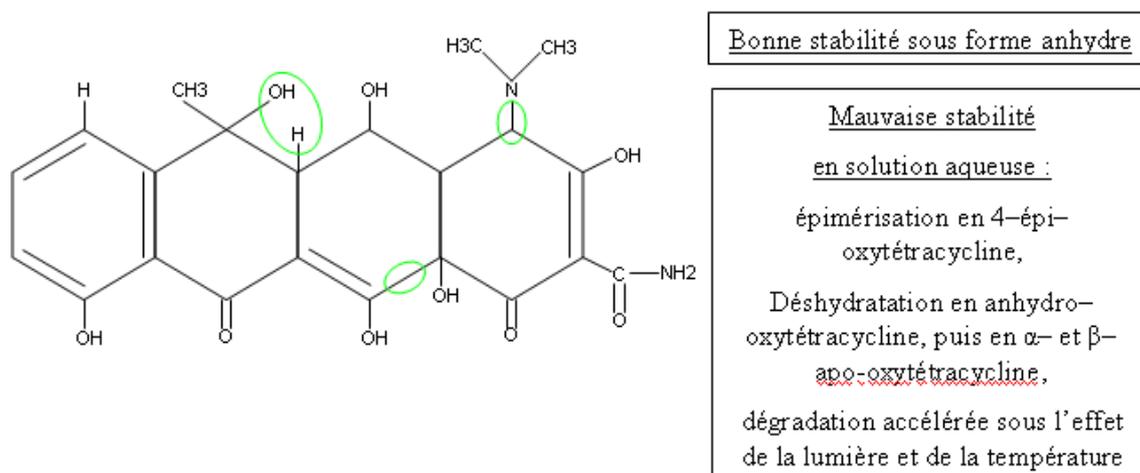


Figure 5 : stabilité et persistance dans l'eau de l'oxytétracycline

2.2 – Pharmacologie :

2.2.1 - Pharmacocinétique

La pharmacocinétique de l'oxytétracycline est bien décrite chez les Mammifères terrestres et de mieux en mieux chez les poissons. Elle l'est beaucoup moins bien chez la crevette, à fortiori pour l'état larvaire. On peut mentionner une étude sur ce sujet, mais elle concerne des crevettes juvéniles de l'espèce *Litopenaeus setiferus* [22].

2.2.2 – Activité antibactérienne

• Mode d'action :

L'action bactériostatique de l'oxytétracycline est une inhibition de la biosynthèse des protéines bactériennes. L'oxytétracycline fixée à la sous-unité ribosomale 30S empêche l'association de l'aminocyl-ARNt avec le ribosome bactérien.

• Spectre antibactérien :

L'activité antibactérienne de l'oxytétracycline est à spectre large sur les bactéries à Gram négatif et positif.

Tableau III : spectre antibactérien de l'oxytétracycline

Gram positif			Gram négatif		
<i>Clostridium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Renibacteriu m</i>	<i>Yersinia, Photobacteriu m</i>	<i>Aeromonas, Edwardsiella, Vibrio</i>	<i>Pseudomonas</i>
TS	S	R	TS	S	R

TS : très sensible, S : sensible, R : résistant

• Résistances bactériennes :

Les gènes de résistance sont surtout portés par des plasmides et/ou des transposons, plus rarement par des chromosomes. Trois mécanismes de résistance ont été identifiés [3] [12] [19] :

- chez les bactéries Gram négatif, il existe dix-huit classes de résistance. Le mécanisme de la résistance est une excrétion transmembranaire active de l'oxytétracycline après pénétration dans la bactérie. Cette excrétion est contrôlée par des pompes à efflux (TET-protéines), dont les déterminants sont portés par des plasmides. Le résultat est une diminution intrabactérienne de la concentration en oxytétracycline, qui limite l'effet bactériostatique,

- chez certaines bactéries Gram positif, il existe neuf classes de résistance. Le mécanisme est une modification de la structure de la sous-unité ribosomale 30S qui empêche la fixation de l'oxytétracycline,

- un mécanisme encore non élucidé mettrait en jeu une protéine ribosomale plus petite.

2.2.3 - Effets indésirables et toxiques

L'étude des effets indésirables et toxiques de l'oxytétracycline est bien décrite chez les mammifères terrestres et de mieux en mieux chez les poissons. Deux publications présentent l'étude des effets toxiques des antibiotiques en élevage larvaire de crevettes [1] [24]. En considérant la Concentration Létale cinquante pourcents (CL50) comme principal descripteur de la toxicité aiguë, certains scientifiques placent l'oxytétracycline au 3ème rang des molécules les plus sûres d'emploi parmi douze testées chez les larves de *Litopenaeus stylirostris* [24]. La partie "Innocuité et détermination des CL50" est consacrée à la recherche d'éventuels effets toxiques aigus de l'oxytétracycline.

2.2.4 - Résidus

Les Limites maximale de résidus (LMR) sont fixées au niveau européen par la Commission des communautés, sur proposition du Comité des Médicaments Vétérinaires (CVMP) de l'Agence Européenne d'Évaluation des Médicaments (EMEA). Elles sont publiées au Journal Officiel des Communautés et acquièrent alors une valeur réglementaire dans toute l'Union Européenne.

L'oxytétracycline appartient à l'annexe I du règlement 2377/90/CEE (liste des substances pharmacologiquement actives pour lesquelles des Limites Maximales de Résidus ont été fixées). La LMR préconisée par le CVMP/EMEA pour l'oxytétracycline est de 100 µg/kg (LMR« toutes espèces » dans le tissu cible « chair »).

Au niveau local, le Service d'Inspection Vétérinaire Alimentaire et Phytosanitaire (SIVAP) s'appuie sur les recommandations du Codex alimentarius (organisme international constitué sous l'égide l'OMS et de la FAO) avec une LMR de 200 µg/kg pour cet antibiotique dans les muscles des crevettes Pénéides.

La production de crevettes de la Nouvelle-Calédonie étant destinée pour une part importante à l'export, notamment vers l'UE, il apparaît plus raisonnable de prendre comme référence une LMR de 100 µg/kg.

2.3 – Thérapeutique :

2.3.1 - Indications

L'oxytétracycline est employée ici dans le cadre d'un plan d'antibio-prévention pour limiter en priorité l'impact de la flore vibrionacée. On peut remarquer que l'oxytétracycline est aussi utilisée en pisciculture marine dans le traitement des vibrioses (*Vibrio anguillarum*) et des pasteurelloses (*Photobacterium damsela*).

2.3.2 - Mode d'administration et posologie

L'oxytétracycline est administrée par balnéation directement dans l'eau d'élevage. La posologie correspond à la concentration C_{otc} déterminée dans la partie « Sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution ». La durée et le rythme d'administration préconisés sont présentés dans la partie « Efficacité ».

2.3.3- Spécialités pharmaceutiques vétérinaires éligibles

Il existe de nombreuses spécialités pharmaceutiques vétérinaires à base d'oxytétracycline.

Trois spécialités françaises possèdent les caractéristiques requises

Tableau IV : spécialités pharmaceutiques vétérinaires éligibles à base d'oxytétracycline

Spécialités pharmaceutiques vétérinaires	Teneur en chlorhydrate d'oxytétracycline	Nature des excipients	Forme galénique et conditionnement	Coût ¹
Oxytétracycline 50% Avitec ND (Laboratoire Virbac santé animale)	50%	inconnue	Poudre orale hydrosoluble	56,60 euros HT soit 6754,18 CFP HT par 5kg
Acti tetra b ND (Laboratoire Biové)			Boîte à 10 sachets de 100 g Boîte de 1 kg Boîte de 5 kg	54,96 euros HT soit 6558,47 CFP HT par 5kg
Compomix v terrasol ND (Laboratoire Noé-Socopharm)			Poudre orale hydrosoluble Boîte de 1 kg Boîte de 5 kg	non communiqué

¹ Les prix indiqués à titre indicatif correspondent au prix d'approvisionnement d'un vétérinaire en métropole. Il faut donc ajouter les frais d'acheminement, de douane et la marge du vétérinaire.

III - L'ASSOCIATION TRIMÉTHOPRIME (1) – SULFADIAZINE (5)

Composés organiques artificiels, la sulfadiazine de la famille des sulfonamides et le triméthoprimine de la famille des diaminopyrimidines sont deux antibactériens bactériostatiques à spectre large agissant sur les bactéries à Gram négatif et positif. L'association de ces deux antibiotiques, par la complémentarité de leurs mécanismes d'action, offre une activité synergique conduisant à la bactéricidie et à une diminution du risque de développement des résistances.

3.1– Pharmacie chimique :

2.1.1 - Structures

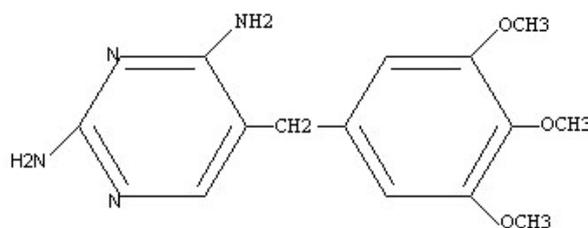


Figure 6 : structure du triméthoprimine

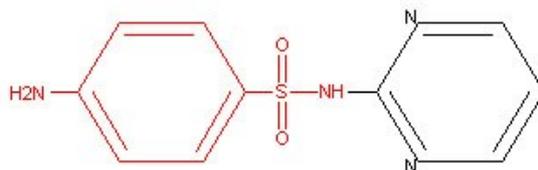


Figure 7 : structure de la sulfadiazine

3.2.2 - Propriétés physiques

- Le triméthoprimine se présente comme une poudre cristalline blanche ou blanc-jaune, de masse molaire de 290,3 g/mol et de point de fusion compris entre 199°C à 203°C. La sulfadiazine se présente comme une poudre cristalline blanche, de masse molaire 249,3.
- La présence de plusieurs doubles liaisons conjuguées explique l'absorption de ces molécules dans l'ultraviolet ($\lambda_{\text{max}} = 271 \text{ nm}$ pour le triméthoprimine, $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$ pour la sulfadiazine)
- Ces deux antibactériens sont solubles dans les solvants organiques. Le triméthoprimine est très peu soluble dans l'eau (0,4mg/mL) et assez soluble dans le méthanol (12,1mg/mL), le propylène glycol (25,7mg/mL) et l'alcool benzylique (72,9mg/mL). Le sel sodique de sulfadiazine est soluble dans l'eau.

3.2.3 - Propriétés chimiques

- Le triméthoprime manifeste un caractère basique qui s'explique par la présence des fonctions amines primaires aromatiques.

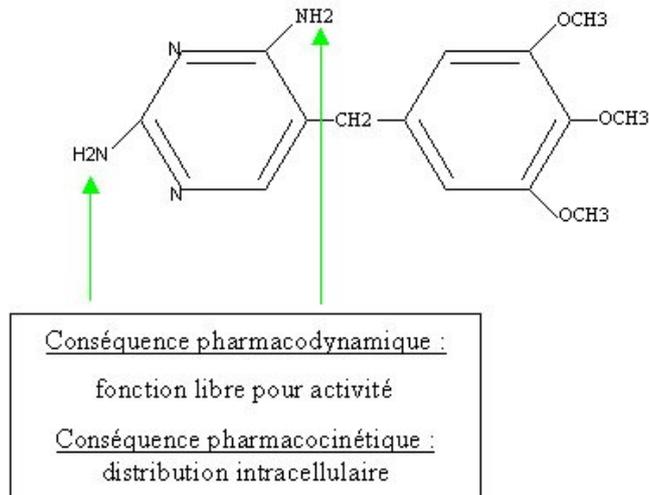


Figure 8 : caractère basique du triméthoprime

- La sulfadiazine possède des propriétés amphotères à prédominance acide

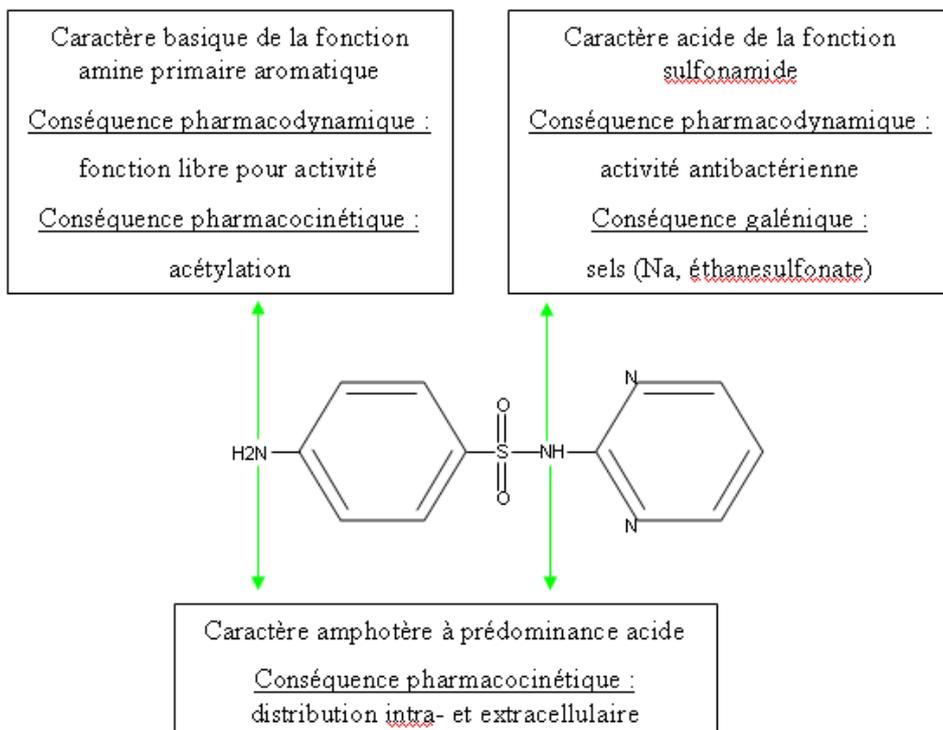


Figure 9 : caractère amphotère à prédominance acide de la sulfadiazine

3.2 – Pharmacologie :

3.2.1 - Pharmacocinétique

La pharmacocinétique de l'association triméthoprime - sulfadiazine a été peu décrite chez la crevette. On peut mentionner une étude sur l'association orméthoprime – sulfadiméthoxine chez des crevettes juvéniles de l'espèce *Litopenaeus vannamei* [20].

3.2.2 – Activité antibactérienne

• Mode d'action

Bactériostatiques pris individuellement, ces deux principes actifs forment une association bactéricide. En inhibant à deux niveaux différents la synthèse des acides foliques, ils empêchent la synthèse des acides nucléiques des bactéries.

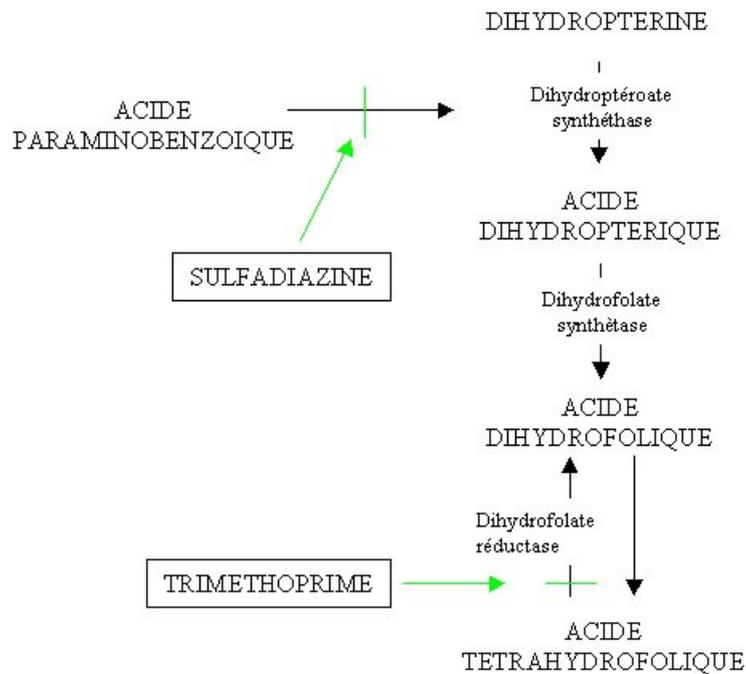


Figure 10 : action antibactérienne séquentielle de l'association triméthoprime - sulfadiazine

• Spectre antibactérien

Tableau V : spectre antibactérien de l'association triméthoprime – sulfadiazine

Gram positif			Gram négatif			
<i>Clostridium</i> <i>m</i>	<i>Streptococcus</i> <i>s</i>	<i>Renibacterium</i> <i>m</i>	<i>Yersinia</i> , <i>Photobacterium</i> <i>m</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Vibrio</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>s</i>	
S	TS	R	S	S	R	sulfadiazine
S	TS	R	S	TS	R	triméthoprime

• Résistances bactériennes

La sulfadiazine et le triméthoprimé présentent des résistances nombreuses, se développant rapidement quand ils sont utilisés isolément. Leur association réduit le risque d'apparition des résistances, mais il n'est pas négligeable.

Les gènes de résistance sont portés soit par des plasmides, soit par des transposons, soit par des chromosomes [19].

Quatre mécanismes de résistance ont été identifiés pour le triméthoprimé :

- présence de dihydrofolate-réductases peu sensibles ou résistantes à l'inhibition par le triméthoprimé (bactéries des genres *Neisseria* et *Nocardia*),
- hyperproduction de dihydrofolate-réductases,
- perméabilité réduite au triméthoprimé, par diminution du nombre de porines à la surface de la membrane externe (bactéries des genres *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Serratia*),
- déficience en thymidilate-synthétase, et approvisionnement en thymine ou en thymidine exogène (pas de synthèse de l'acide folique).

Trois mécanismes de résistance ont été identifiés pour les sulfonamides :

- hyperproduction de l'acide paraminobenzoïque,
- hyperproduction de la dihydroptéroate synthétase,
- altération de la dihydroptéroate synthétase, avec une affinité plus faible pour les sulfonamides.

3.2.3 - Effets indésirables et toxiques

Les effets indésirables et toxiques de l'association triméthoprimé - sulfadiazine ont été peu décrits chez la crevette. En considérant la CL50 comme principal descripteur de la toxicité aiguë, certains scientifiques placent le Romet 30 ND (orméthoprimé – sulfadiméthoxine) au 5ème rang des molécules les plus sûres d'emploi, parmi douze testées chez les larves de *Litopenaeus stylirostris* [24]. La partie "Innocuité et détermination des CL50" de ce rapport est consacrée à la recherche d'éventuels effets toxiques aigus de l'association triméthoprimé - sulfadiazine.

3.2.4 - Résidus

Le triméthoprimé et la sulfadiazine appartiennent à l'annexe I du règlement 2377/90/CEE (liste des substances pharmacologiquement actives pour lesquelles des Limites Maximales de Résidus ont été fixées). La LMR préconisée pour le triméthoprimé est de 50 µg/kg (LMR « toutes espèces sauf équidés », dans le tissu cible « chair »). La LMR préconisée pour la sulfadiazine est de 100 µg/kg (LMR « toutes espèces » dans le tissu cible « chair »). Au niveau local, le SIVAP recommande une LMR de 200 µg/kg pour cet antibiotique dans les muscles des crevettes Pénéides.

La production de crevettes de la Nouvelle-Calédonie étant destinée pour une part importante à l'export, notamment vers l'UE, il apparaît plus raisonnable de prendre comme références une LMR de 50 µg/kg pour le triméthoprimé et une LMR de 100 µg/kg pour la sulfadiazine.

3.3 – Thérapeutique :

3.3.1 - Indications

L'association triméthoprimé - sulfadiazine sera ici employée dans le cadre d'un plan d'antibioprévention pour limiter en priorité l'impact de la flore vibrionacée.

On peut remarquer qu'elle est aussi utilisée en pisciculture marine dans le traitement des vibrioses (*Vibrio anguillarum*) et des pasteurelloses (*Photobacterium damsela*).

3.3.3 – Mode d'administration et posologie

L'association triméthoprime - sulfadiazine est administrée par baignade directement dans l'eau d'élevage. La posologie correspond à la concentration C_{tmpsulfa} déterminée dans la partie « Sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution ». La durée et le rythme d'administration préconisés sont présentés dans la partie « Efficacité ».

3.3.4 – Spécialité pharmaceutique vétérinaire éligible

Aucune spécialité pharmaceutique vétérinaire française ou européenne ne rassemble les caractéristiques recherchées pour un usage en élevage larvaire. Les pré-mélanges médicamenteux ne sont pas utilisables tels quels dans l'eau d'élevage pour des raisons réglementaires. Les solutions injectables présentent des conditionnements à la taille inadaptée (flacons de 50 mL) et au coût élevé (Tribrissen injectable ND). Aucune poudre orale n'existe et aucune solution ou suspension orale n'a de teneur suffisante en principes actifs. (10% d'antibiotiques dans Adjusol tmp sulfa ND, 5% dans Tribrissen suspension orale ND, 22,4% dans Diproxine ND)

Fonfreyde et Pham ont évoqué la possibilité d'utiliser des spécialités d'un pays tiers et c'est finalement une spécialité australienne qui nous a paru la plus appropriée.

Tableau VI : spécialité pharmaceutique vétérinaire éligible à base de triméthoprime - sulfadiazine

Spécialité pharmaceutique vétérinaire	Teneur en triméthoprime (1) – sulfadiazine (5)	Nature des excipients	Forme galénique et conditionnement	Coût
Trimsul ND (Entreprise Ridley Agriproducts)	50%	inconnue	Poudre orale hydrosoluble Sac de 1 kg	16465 CFP TTC par kg < Tribrissen injectable ND

Troisième partie

**ESSAIS MENÉS AU LAC IFREMER
EN VUE DE LA SUBSTITUTION
DE L'ÉRYTHROMYCINE**

Les essais décrits dans cette troisième partie ont eu lieu de mai à novembre 2003 au LAC Saint-Vincent. La démarche employée comprend trois étapes et s'appuie sur l'hypothèse énoncée en introduction : **l'administration d'un antibiotique de substitution doit provoquer une réduction de la flore bactérienne équivalente à celle obtenue avec le traitement de référence à base d'érythromycine.**

- La première étape est une approche originale de détermination in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Cette étude a été menée avec le chlorhydrate d'oxytétracycline et l'association triméthoprimé – sulfadiazine sur les flores Vibrionacée et hétérotrophe totale à partir de prélèvements d'eau de bacs d'élevage de quatre écloséries : LAC Saint-Vincent, Nord, Mara, Montagnès. Des concentrations C_{otc} et $C_{tmpsulfa}$ ont ainsi été déterminées, qui sont utilisées dans les deux étapes suivantes.
- La deuxième étape est une étude de l'innocuité des antibiotiques de substitution pour les larves de crevettes. Au cours d'un essai de toxicité aiguë, les animaux sont exposés pendant 96 heures à des gammes de concentrations d'antibiotiques. L'évolution de la mortalité et le passage des stades larvaires sont suivis quotidiennement pour déterminer la sécurité d'emploi pour les larves de crevettes du chlorhydrate d'oxytétracycline et de l'association triméthoprimé – sulfadiazine.
- L'objet de la dernière étape est de proposer des protocoles d'antibioprévention de substitution, puis de les évaluer en élevage larvaire dans des bacs de différents volumes. Les essais se sont déroulés sur trois productions à l'écloserie du LAC Saint-Vincent. Les protocoles testés ont été élaborés en s'appuyant sur les concentrations C_{otc} et $C_{tmpsulfa}$, déterminées préalablement et en adaptant les posologies et les rythmes d'administration en fonction des résultats observés au cours de l'élevage larvaire. A cette fin, la survie larvaire et la distribution des stades larvaires ont été étroitement suivies.

Sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution

I – MATÉRIELS ET MÉTHODES

• L'essai « Differential plating » consiste à dénombrer les bactéries qui se développent après ensemencement d'une fraction diluée d'un échantillon d'eau d'écloserie sur gélose de Mueller-Hinton (MH) additionnée de 2,5% de NaCl et sur gélose Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS). Il est mené sur :

- une série en présence d'érythromycine à différentes concentrations,
- une série en présence d'oxytétracycline à différentes concentrations,
- une série en présence de triméthoprime - sulfadiazine, à différentes concentrations.

• Des courbes "Dénombrement bactérien en fonction de la concentration en antibiotique" sont ainsi établies et l'on détermine la concentration d'antibiotique nécessaire pour obtenir une réduction de la flore, équivalente à celle obtenue avec 2 g/m³ d'érythromycine (traitement de référence).

• Le matériel et les consommables nécessaires pour chaque essai « Differential plating » sont exposés en annexe 3.

1.1 - Préparation des géloses avec antibiotiques :

• On prépare tout d'abord **une solution mère d'antibiotique : 1 mg/mL** en tenant compte de la pureté et de la forme de l'antibiotique. Les antibiotiques purs ont été achetés chez SIGMA.

Tableau VII : préparation des solutions d'antibiotiques

	Érythromycine E6376	Oxytétracycline O5875	Triméthoprime (1) T7883	Sulfadiazine (5) S6387
Forme	base	chlorhydrate	base	sel sodique
Formule brute	C37H67NO13	C22H24N2O9.HCl	C14H18N4O3	C10H9N4NaO2S
Masse molaire de l'AB avec le sel, le cas échéant	733,9 g/mol	496,9 g/mol	290,3 g/mol	272,3 g/mol
Masse molaire du principe actif seul	733,9 g/mol	460,4 g/mol	290,3 g/mol	249,3 g/mol
Pureté (donnée fournisseur)	93,90%	96%	99%	99%
Nature du solvant	éthanol	eau distillée stérile	éthanol	
Concentration désirée	1 mg/mL	1 mg/mL	1/6 mg/mL + 5/6 mg/mL	
Quantité d'AB à apporter dans une fiole de 50mL	53,2 mg	56,2 mg	8,4 mg + 46 mg	

À cette fin, on utilise une fiole jaugée de 50 mL stérile par antibiotique ou association d'antibiotiques. La pesée de l'antibiotique est effectuée directement dans la fiole de 50 mL avec une balance précise au dixième de milligramme. De l'eau distillée stérile est ensuite ajoutée pour atteindre le volume de 50 mL.

- On prépare ensuite des solutions filles d'antibiotique dans trois fioles stériles jaugées de 25 mL. À l'aide d'une micropipette on prélève 2,5 mL de la solution mère que l'on transfère dans une fiole, puis on complète avec de l'eau distillée stérile à 25 mL.

On opère de façon similaire pour obtenir les autres solutions filles :

- En rose, solution d'antibiotique à 100µg/mL,
- En marron, solution d'antibiotique à 10µg/mL,
- En gris, solution d'antibiotique à 1µg/mL,

Tableau VIII : préparation des gélases

Concentration souhaitée en antibiotique (µg/mL)	Volume d'eau distillée (µL)	Volume d'antibiotique (µL)
0	2000	/
2 ⁻⁵ (0,03125)	1375	625
2 ⁻⁴ (0,0625)	1875	125
2 ⁻³ (0,125)	1750	250
2 ⁻² (0,25)	1500	500
2 ⁻¹ (0,5)	1900	100
2 ⁰ (1)	1800	200
2 ¹ (2)	1600	400
2 ² (4)	1920	80
2 ³ (8)	1840	160
2 ⁴ (16)	1680	320

- Puis on dépose 2 mL de la solution d'antibiotique à la micropipette dans chaque boîte de Petri stérile vide. On coule 18 mL de gélose en surfusion (température idéale du bain-marie 63°C). On homogénéise par rotation de la boîte. Les boîtes ainsi préparées sont placées à l'étuve à 20°C la veille des étalements.

NB : Les gélases avec l'oxytétracycline sont stockées à l'abri de la lumière.

1.2 – Prélèvements d'eau d'écloseries :

- Un prélèvement d'eau par éclosion sur un bac d'élevage larvaire de 10m³ est effectué à J3 le matin vers huit heures avant tout traitement antibiotique. Ce prélèvement est effectué à l'aide d'une pipette stérile de 20 mL, le choix du bac se faisant au hasard.

1.3 - Dilutions d'eau d'éclosion :

- Différentes dilutions de cet échantillon sont préparées, pour obtenir une dilution lisible. Pour cela, 500 µL de l'échantillon est mélangé à 4,5 mL d'eau de mer stérile dans un tube à dilution. On réitère l'opération pour obtenir les dilutions de 10⁰ à 10⁻³.

1.4 - Essai en parallèle érythromycine / oxytétracycline / triméthoprime - sulfadiazine :

• Les boîtes de Pétri contenant la gélose et une concentration d'antibiotique étant prêtes au préalable :

- 100 μL d'eau d'écloserie à 10^0 sont étalés à la surface de géloses TCBS,
- 100 μL d'eau d'écloserie à 10^{-1} sont étalés à la surface de géloses TCBS,
- 100 μL d'eau d'écloserie à 10^{-2} sont étalés à la surface de géloses MH + 2,5%NaCl,
- 100 μL d'eau d'écloserie à 10^{-3} sont étalés à la surface de géloses MH + 2,5%NaCl.

Les boîtes sont placées à l'étuve à 28°C pendant 48 heures pour les géloses de MH+2,5% de NaCl et 24 heures pour les géloses TCBS.

1.5 - Courbes "Dénombrement bactérien en fonction de la concentration en antibiotique" :

• Après comptage des colonies dans chaque boîte, les données sont traduites en courbes :

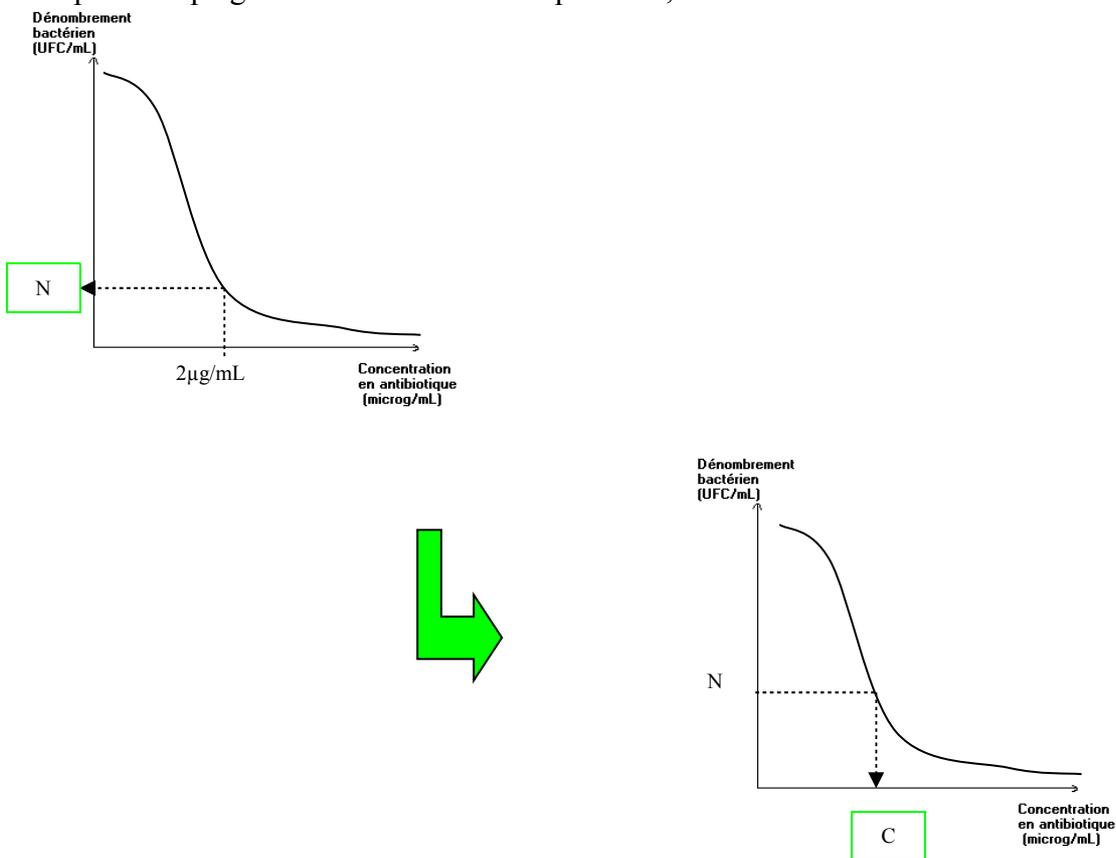


Figure 21 : détermination de la concentration d'essai pour l'antibiotique de substitution

• On détermine la concentration C d'antibiotique qui provoque une réduction de la flore équivalente à celle obtenue lorsqu'on utilise l'érythromycine à la posologie habituelle, considéré comme traitement de référence. La concentration C et des multiples de cette concentration C seront utilisés dans les essais d'innocuité et d'efficacité *in vivo*.

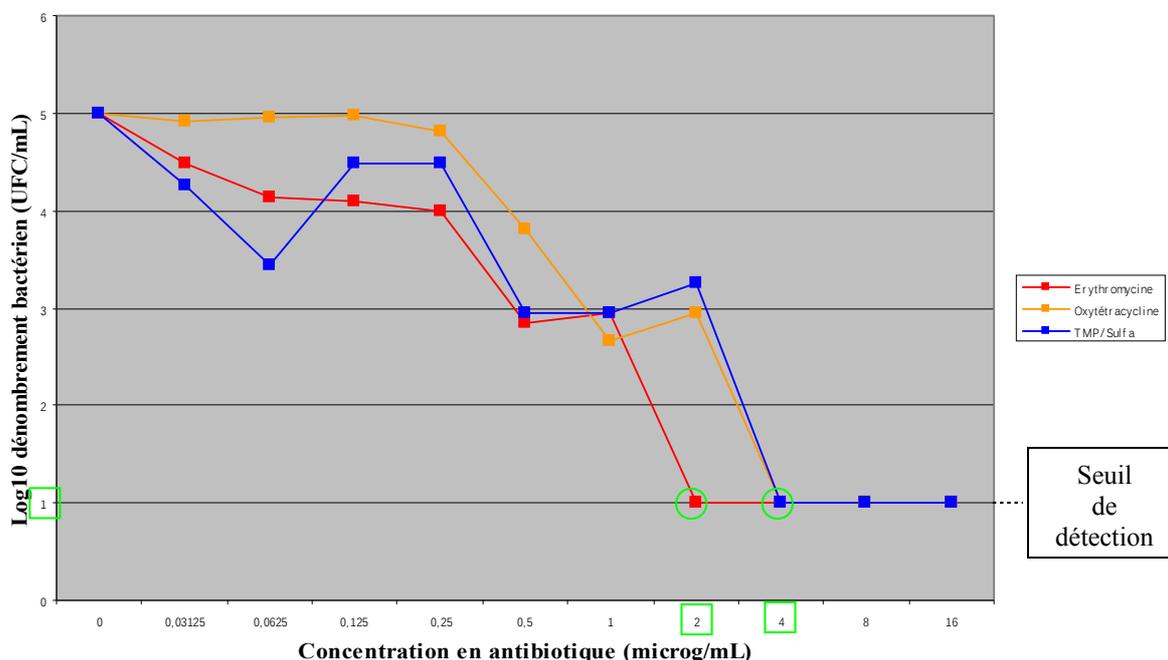
II - RÉSULTATS

Les essais "Differential plating" ont été effectués de juillet à septembre à partir d'un prélèvement d'eau de bac d'élevage de chaque écloserie. Seules les courbes " Dénombrement bactérien en fonction de la concentration en antibiotique " de l'écloserie du Nord sont ici présentées pour décrire la sensibilité de la flore hétérotrophe totale aux antibiotiques de substitution. Deux tableaux récapitulent les valeurs de concentrations C obtenues dans les autres écloséries pour la flore hétérotrophe totale et la flore Vibrionacée.

2.1 – Courbes " Dénombrement bactérien en fonction de la concentration en antibiotique " :

• À l'écloserie du Nord, le traitement de référence de 2 µg/mL d'érythromycine provoque une réduction de la flore hétérotrophe totale telle que l'on n'observe pas de colonies sur les géloses MH + 2,5% NaCl. D'après l'hypothèse posée (voir Matériels et Méthodes), on considère dans ce cas que l'effectif bactérien N est égal au seuil de détection 10 UFC/mL. On recherche ensuite les concentrations C_{otc} sur la courbe orange et $C_{tmpsulfa}$ sur la courbe bleue pour lesquelles on retrouve cet effectif. On trouve ainsi après étude de la courbe de résistance de la flore hétérotrophe totale de l'écloserie du Nord :

$$\begin{aligned} N &= 10 \text{ UFC/mL} \\ C_{otc} &= 4 \text{ µg/mL} \\ C_{tmpsulfa} &= 4 \text{ µg/mL} \end{aligned}$$



Graph 1 : courbe de résistance de la flore hétérotrophe totale de l'écloserie du Nord

• En suivant la même démarche les valeurs des concentrations C ont été déterminées pour les quatre écloséries en considérant la flore hétérotrophe totale et la flore Vibrionacée.

Tableau IX : détermination des concentrations C à partir des courbes de résistance de la flore hétérotrophe totale

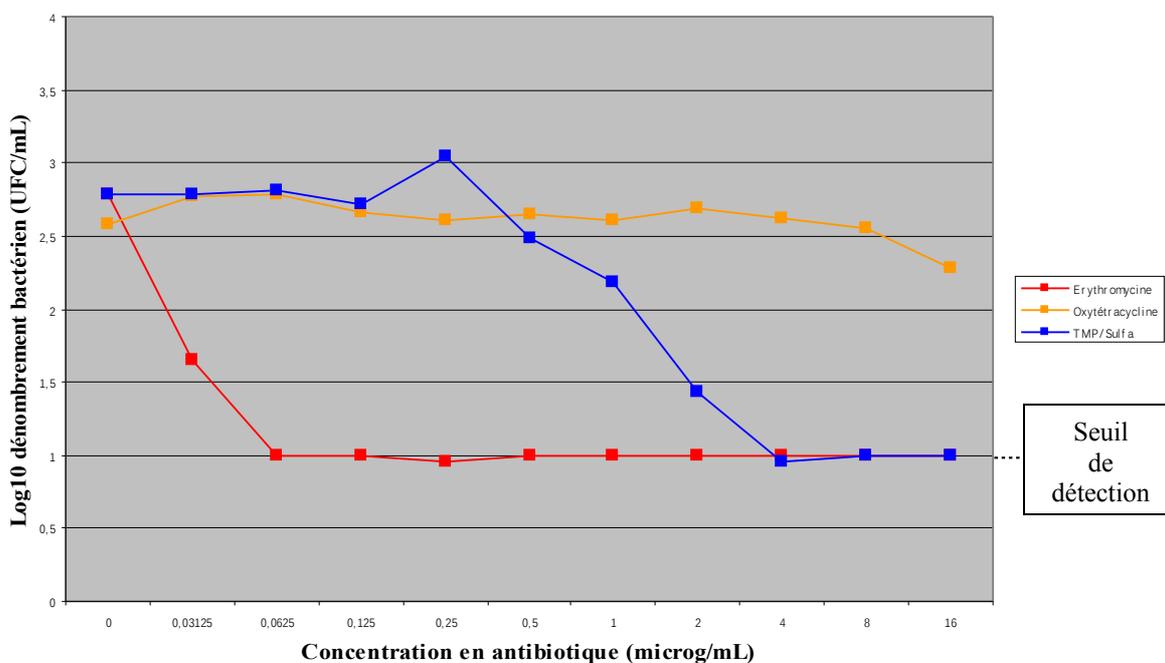
concentrations en antibiotiques pour obtenir N = 10 UFC/mL	écloserie du LAC Saint - Vincent	écloserie du Nord	écloserie de Mara	écloserie de Montagnès
érythromycine	0,5 µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL	4 µg/mL
oxytétracycline	16 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
Triméthoprime - sulfadiazine	1 µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL	1 µg/mL

Tableau X : détermination des concentrations C à partir des courbes de résistance de la flore Vibrionacée

concentrations en antibiotiques pour obtenir N = 10 UFC/mL	écloserie du LAC Saint - Vincent	écloserie du Nord	écloserie de Mara	écloserie de Montagnès
érythromycine	0,0625 µg/mL	0,0625 µg/mL	0,03125 µg/mL	0,03125 µg/mL
oxytétracycline	>16 µg/mL	>16 µg/mL	>16 µg/mL	8 µg/mL
Triméthoprime - sulfadiazine	4 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL

2.1 – Incident lors de l'étude de la sensibilité de la flore Vibrionacée à l'oxytétracycline :

- L'aspect des courbes de résistance de la flore Vibrionacée et les valeurs très élevées des concentrations C pour l'oxytétracycline (en grisé dans le tableau X) nous font suggérer qu'un incident est survenu lors de ces essais (Voir III Discussion).



Graphique 2 : courbe de résistance de la flore Vibrionacée de l'écloserie du LAC Saint – Vincent

III - DISCUSSION

Après avoir observé de grandes différences dans la réponse des bactéries aux antibiotiques de substitution, le choix des concentrations finales C_{otc} et $C_{tmpsulfa}$ s'appuie à la fois sur les résultats des essais "Differential plating" et de précédents travaux.

3.1 – Variabilité de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution :

3.1.1 - Sensibilité de la flore hétérotrophe totale

- L'action antibactérienne de l'érythromycine sur la flore hétérotrophe totale est observée dès les plus faibles concentrations d'antibiotique. À 2 µg/mL d'érythromycine, la réduction de la flore est telle qu'aucune colonie n'est dénombrée sur les géloses MH+2,5%, sauf avec les échantillons d'eau provenant des écloséries de Montagnès et de Mara. On cherchera donc une concentration C d'antibiotique de substitution telle que le dénombrement bactérien N soit égal au seuil de détection 10 UFC/mL.

- L'oxytétracycline agit à des concentrations plus importantes. Pour obtenir un dénombrement bactérien N équivalent à 10 UFC/mL, il faut 2 µg/mL d'oxytétracycline avec l'échantillon d'eau provenant de l'écloserie de Montagnès, 4 µg/mL d'oxytétracycline avec l'échantillon d'eau provenant de l'écloserie du Nord et 8 µg/mL d'oxytétracycline avec l'échantillon d'eau provenant de l'écloserie de Mara. L'utilisation de l'oxytétracycline semble inadaptée à l'écloserie du LAC Saint-Vincent ($C > 16\mu\text{g/mL}$). Il serait intéressant d'y effectuer de nouveaux essais de « Differential Plating » pour confirmer ou infirmer cette observation. Le choix d'une concentration C_{otc} d'essai s'appuie donc sur les courbes des écloséries privées.

- L'association triméthopime - sulfadiazine agit aussi à des concentrations plus élevées que l'érythromycine. Pour obtenir un dénombrement bactérien N équivalent à 10 UFC/mL, il faut 1 µg/mL de cette association avec l'échantillon d'eau provenant des écloséries de Montagnès et du LAC Saint-Vincent, 4 µg/mL de cette association avec l'échantillon d'eau provenant de l'écloserie du Nord. L'utilisation de l'association triméthopime - sulfadiazine semble inadaptée à l'écloserie de Mara ($C > 16\mu\text{g/mL}$). Le choix d'une concentration $C_{tmpsulfa}$ d'essai s'appuie donc sur les courbes des écloséries de Saint-Vincent, de Montagnès et du Nord.

3.1.2 - Sensibilité de la flore Vibrionacée

Il n'existe pas à proprement parler de milieu de culture pour tester la sensibilité aux antibiotiques de la seule flore vibrionacée. Le milieu TCBS, utilisé pour le dénombrement et l'isolement a donc été choisi par défaut.

- L'action antibactérienne de l'érythromycine sur la flore vibrionacée est observée dès les plus faibles concentrations d'antibiotique. À 2 µg/mL d'érythromycine, la réduction de la flore est telle qu'aucune colonie n'est dénombrée sur les géloses TCBS. On cherchera donc une concentration C d'antibiotique de substitution telle que le dénombrement bactérien N soit égal à 10 UFC/mL, comme pour la flore hétérotrophe totale.

- L'action antibactérienne de l'oxytétracycline ne peut ici être caractérisée convenablement. L'absence d'effet sur la flore vibrionacée aux concentrations habituellement actives et l'aspect général des courbes font penser à une interaction entre l'oxytétracycline et des constituants du milieu TCBS.

Ce milieu comprend de nombreux composants dont le citrate ferrique et la bile de bœuf qui sont peut-être responsables de cette interaction. (composition du milieu TCBS : 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 boeuf, 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).

- L'association triméthoprim - sulfadiazine agit à des concentrations plus élevées que l'érythromycine. Pour obtenir un dénombrement bactérien N équivalent à 10 UFC/mL, il faut 4 µg/mL de cette association avec les échantillons d'eau provenant des écloséries du LAC Saint-Vincent, du Mara et de Montagnès et 8 µg/mL avec l'échantillon d'eau provenant de l'écloserie du Nord.

3.2 – Détermination des concentrations d'essai C_{otc} et $C_{tmpsulfa}$:

- Si l'on se réfère aux tableaux IX et X, il est difficile de déterminer des concentrations C_{otc} et $C_{tmpsulfa}$ qui puissent être utilisées telles quelles dans un protocole standard opérationnel dans les quatre écloséries. Il est tout de même intéressant de retenir les valeurs $C_{otc} = 4 \mu\text{g/mL}$ et $C_{tmpsulfa} = 4 \mu\text{g/mL}$ qui ont été déterminées précédemment avec la courbe de résistance de la flore hétérotrophe totale de l'écloserie du Nord.

- Merlaut (2001) a travaillé sur la mise au point d'un plan d'antibioprévention à base de Tribriessen ND (triméthoprim – sulfadiazine) administré en balnéation [18]. La démarche employée était différente. Les protocoles dérivait du traitement de référence à base d'érythromycine. Le rythme et la posologie étant déterminés après des essais directement en élevage larvaire dans différents volumes (scobs de 150 L et bacs de 2 m³). Les critères d'évaluation de ces protocoles étaient la survie larvaire estimée et le contrôle du développement des flores hétérotrophe totale et Vibrionacée. Les essais en petits volumes de 150 L du protocole à base de Tribriessen ND à 10mL/m³/j de J3 à J9 satisfaisaient ces critères. On peut noter que 10mL/m³ de Tribriessen ND correspond à 4,8 g/m³ (4,8 µg/mL) de principes actifs antibactériens. Cette dose est du même ordre de grandeur que la concentration $C_{tmpsulfa}$ obtenue in vitro dans la présente étude.

- L'écloserie privée de Montagnès a présenté des résultats encourageants d'essais effectués avec l'oxytétracycline en conditions réelles d'élevage en bacs de 10m³. Leur protocole s'appuyait sur une "dose d'attaque" $C = 5\text{g/m}^3$ (5 µg/mL) de chlorhydrate d'oxytétracycline pur. Cette dose est ici encore du même ordre de grandeur que la concentration C_{otc} obtenue in vitro.

- Le choix des concentrations finales s'appuie donc sur l'étude de la réponse de la flore hétérotrophe totale, sur les travaux de Merlaut et sur les essais effectués avec l'oxytétracycline à l'écloserie privée de Montagnès.

IV – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

• En tenant compte des remarques précédentes, les concentrations C_{otc} et $C_{tmpsulfa}$ retenues sont telles que le dénombrement bactérien N soit égal à 10 UFC/mL :

$N = 10 \text{ UFC/mL}$ $C_{otc} = 5 \text{ } \mu\text{g/mL (5 g/m}^3\text{)}$ $C_{tmpsulfa} = 4,8 \text{ } \mu\text{g/mL (4,8 g/m}^3\text{)}$
--

On peut noter que la concentration de $4,8 \text{ g/m}^3$ correspond à 10 mL/ m^3 de Tribriksen ND et à 10 g/m^3 de Trimsul ND, qui sont deux spécialités pharmaceutiques à base de triméthoprim - sulfadiazine.

• Les courbes établies mettent en évidence des différences de sensibilité aux antibiotiques des populations bactériennes d'une écloserie à une autre. À partir d'un protocole standard s'appuyant sur les résultats au LAC Saint-Vincent, des essais en écloseries privées devront être effectués pour adapter au mieux les plans d'antibioprévention.

• De nouveaux essais de « differential plating » seraient nécessaires pour confirmer les observations et dégager une tendance. Il s'agirait d'avoir au moins un triplicata par écloserie pour affiner les courbes de sensibilité. Par ailleurs, il serait intéressant de connaître l'évolution de cette sensibilité en fonction de la saison, l'expérience n'ayant été menée jusqu'à présent que pendant la période juillet-septembre.

• Pour remédier au problème de l'interaction de l'oxytétracycline avec le milieu TCBS, une solution consisterait à ensemercer des géloses TCBS sans antibiotique avec un échantillon d'eau d'écloserie, puis de repiquer les bactéries par la méthode du tampon de velours sur des géloses de MH+2,5% NaCl avec antibiotique.

Innocuité et détermination des CL50

I – MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Les larves de crevette sont exposées à un antibiotique pendant 96 heures au cours d'un essai statique. Un essai statique est un essai au cours duquel il n'y a pas d'écoulement des solutions d'antibiotiques; ces solutions demeurent donc inchangées pendant toute la durée de l'essai.
- La mortalité des larves est enregistrée après 24, 48, 72, 96 heures et la concentration qui provoque la mort de 50% des larves est déterminée (CL50). Les stades larvaires sont déterminés chez les larves survivantes à la fin de l'essai, pour repérer un éventuel retard de croissance.
- Trois séries d'essais sont effectuées. Chaque série comprend un essai par stade larvaire généralement traité, un essai concerne le stade Zoé1-Zoé2 (stade atteint en élevage à J3-J4) et un essai concerne le stade Mysis1 (stade atteint en élevage à J6-J7. Les deux premières séries d'essais permettent d'étudier la toxicité aiguë des antibiotiques aux faibles concentrations et de recadrer la gamme de concentrations pour la détermination de la CL50 lors de la troisième série d'essais.
- Le matériel et les consommables nécessaires pour chaque essai d'innocuité sont décrits en annexe 4.

1.1 - Informations sur les antibiotiques testés :

- On pourra retrouver les informations concernant les propriétés physico-chimiques des principes actifs dans la partie consacrée à la présentation des antibiotiques de substitution.
- Pour l'association triméthoprim - sulfadiazine, le choix s'est porté sur la spécialité pharmaceutique australienne Trimsul ND destinée aux productions aviaires. Dans ces espèces, elle est administrée par voie orale après mise en solution dans de l'eau douce. Des essais d'élevage larvaire de crevettes avec le Trimsul ND à 5, 10 et 20 g/m³ ont mis en évidence sa solubilité moyenne dans l'eau de mer. N'ayant pas trouvé de spécialité appropriée à base d'oxytétracycline avant le début des expériences, il a été décidé de tester le chlorhydrate d'oxytétracycline pur.

1.2 - Déroulement de l'essai :

1.2.1 - Conditions d'exposition

Les essais d'innocuité sont valides lorsque les paramètres de milieu suivent les conditions énoncées dans le tableau XI.

Tableau XI : conditions d'exposition des larves aux antibiotiques lors des essais d'innocuité

Durée	96 heures
Charge	150 larves/L
Lumière	Douze heures d'exposition à la lumière artificielle (néons)
Température	29°C
Oxygène	≥ 60% de la valeur de saturation en air
Salinité	35 g/L
Alimentation	Sans <i>Artemia salina</i> mais avec des microparticules.
Perturbation	Eviter tout ce qui peut modifier le comportement des larves.

1.2.2 - Dénombrement et choix des larves

- De l'eau contenant des larves de l'écloserie est versée dans un tamis. Le tamis est rincé à l'aide d'une pissette remplie d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm et additionnée d'EDTA à 5 mg/L, puis son contenu est déversé dans une cellule de comptage. Les larves sont observées au stéréomicroscope et 150 larves mobiles « non tarées » sont choisies pour chaque bouteille d'essai. Les tamis utilisés pour la sélection des larves ont une maille de 100 µm pour le stade Zoé2 et 235 µm pour le stade Mysis1. L'emploi de ce dernier tamis permet d'éviter le prélèvement des larves d'*Artemia*. Le critère de sélection « non taré » fait appel à l'expérience de Dominique PHAM. Il s'agit avant tout de disposer de bonnes larves qui ne présentent pas de malformations.

- Les larves sont placées dans douze bouteilles remplies avec 900 mL d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm et additionnée d'EDTA à 5 mg/L. Les bouteilles sont placées dans la salle d'expérimentation thermorégulée pour maintenir une température de 29°C dans chaque bouteille pendant la durée de l'expérience. Un bullage individuel comprenant un tube en silicone prolongé d'une pipette pasteur par bouteille est ajouté. Sont ainsi préparées :

- Cinq bouteilles pour l'oxytétracycline
- Cinq bouteilles pour l'association triméthoprime - sulfadiazine,
- Une bouteille témoin positif avec de l'érythromycine à 2mg/L,
- Une bouteille témoin négatif sans antibiotique.

D'après Dominique PHAM les larves de crevettes ne survivraient pas à un jeûne de 96 heures. On évite l'ajout d'algues et de larves d'*Artemia* qui risqueraient d'incorporer les antibiotiques et d'induire un biais à l'épreuve de toxicité. Il est donc décidé de les nourrir seulement à l'aide de micro-particules.

Tableau XII : séquence alimentaire durant les essais d'innocuité

aliment Bernaqua Royal Caviar 5-50	1 mg/L 8,11,14,17h à J3, J4.
aliment Golden Pearls 50-100	5 mg/L 8,11,14,17h à J5, J6, J7.
aliment Golden Pearls 100-200	5 mg/L 8,11,14,17h à J8, J9.

1.2.3 - Préparation des solutions d'antibiotiques

- Une gamme de concentrations d'antibiotiques est ensuite préparée. Pour ce faire, il a été décidé de faire des pesées individuelles dans des béchers à l'aide d'une balance de précision. La mise en solution s'effectue dans ces béchers par l'ajout d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm, additionnée d'EDTA à 5 mg/L. Le contenu du bécher est versé dans une bouteille d'essai, le bécher étant rincé avec la pipette d'eau de mer filtrée de sorte que la

totalité de l'antibiotique pesé soit transférée. De l'eau de mer filtrée est aussitôt ajoutée pour ajuster le volume des bouteilles à 1 L. Dans le cas du témoin sans antibiotique, seul de l'eau de mer filtrée est ajoutée pour compléter le volume. L'épreuve de toxicité démarre une fois cet ajustement de volume effectué.

Tableau XIII : gamme de concentrations et pesée des antibiotiques

Concentration en oxytétracycline ($\mu\text{g/mL}$)	$1C_{\text{otc}}$	$10 C_{\text{otc}}$	$10^2 C_{\text{otc}}$	$10^3 C_{\text{otc}}$	$10^4 C_{\text{otc}}$
Quantité de chlorhydrate d'oxytétracycline pur (mg) à apporter pour une bouteille d'1L	5mg	5.10^1mg	5.10^2mg	5.10^3mg	5.10^4mg
Concentration en triméthoprime (1) - sulfadiazine (5) ($\mu\text{g/mL}$)	$1C_{\text{tmpsulfa}}$	$10 C_{\text{tmpsulfa}}$	$10^2 C_{\text{tmpsulfa}}$	$10^3 C_{\text{tmpsulfa}}$	$10^4 C_{\text{tmpsulfa}}$
Quantité de Trimsul ND à apporter (mg) pour une bouteille d'1L	10mg	10^2mg	10^3mg	10^4mg	10^5mg

- Cette technique a été préférée à la préparation d'une solution mère, d'une solution fille et à la distribution de volumes variables d'antibiotiques pour deux raisons :
 - la solubilité moyenne du Trimsul ND ne garantit pas l'obtention fiable d'une solution mère homogène,
 - la formation d'acide chlorhydrique lors de la mise en solution du chlorhydrate d'oxytétracycline à forte concentration constitue un risque pour la sécurité du manipulateur.

1.2.4 – Observations

- Au bout de 24 heures, le contenu de la bouteille est versé doucement sur une cellule de comptage. On compte au stéréomicroscope les larves vivantes et on en déduit les mortes pour la détermination de la CL50, on replace les larves dans un ballon « de transfert » en verre de 2 L stérile, maintenu à 29°C, équipé d'un bullage individuel. L'ensemble de la bouteille passe ainsi par la cellule de comptage, les larves et leur eau d'élevage sont récupérées dans le ballon de transfert. Une fois la totalité de la bouteille d'un litre analysée, le contenu du ballon est versé dans la bouteille initiale pour la suite de l'expérience. Le ballon est nettoyé entre chaque bouteille évaluée. On réitère le passage sur cellule de comptage pour l'observation au stéréomicroscope à 48, 72 et 96 heures. Le pH, l'oxygène dissous et la température de l'eau sont mesurés aux mêmes heures.

- Pour caractériser plus finement l'effet toxique des antibiotiques de substitution, on recherche chez les larves d'essai un éventuel retard dans le passage des différents stades. À l'issue des 96 h, les larves survivantes de chaque bouteille d'essai sont recueillies sur un tamis de maille de 235 μm . Le tamis est rincé à l'aide d'une pissette remplie de formol à 10%, puis son contenu est déversé dans une cellule de comptage. Les larves sont observées au stéréomicroscope et leurs stades sont déterminés.

1.2.5 – Traitement des résultats

- La détermination d'une CL50 n'est possible que dans le cas où la mortalité dans le groupe témoin ne dépasse pas 10% à la fin de l'essai. Dans le cas où au moins trois points sont

compris entre 5 et 95% de mortalité il est possible d'utiliser une transformation log-probit. On transforme le pourcentage de mortalité cumulée en unités probit, puis on trace la droite « mortalité en fonction de la concentration d'antibiotique ». Il est ensuite possible d'utiliser des méthodes statistiques afin de calculer pour la période d'exposition, la CL50 ainsi que son intervalle de confiance ($p = 0,95$).

II - RÉSULTATS

2.1 – Première série d'essai :

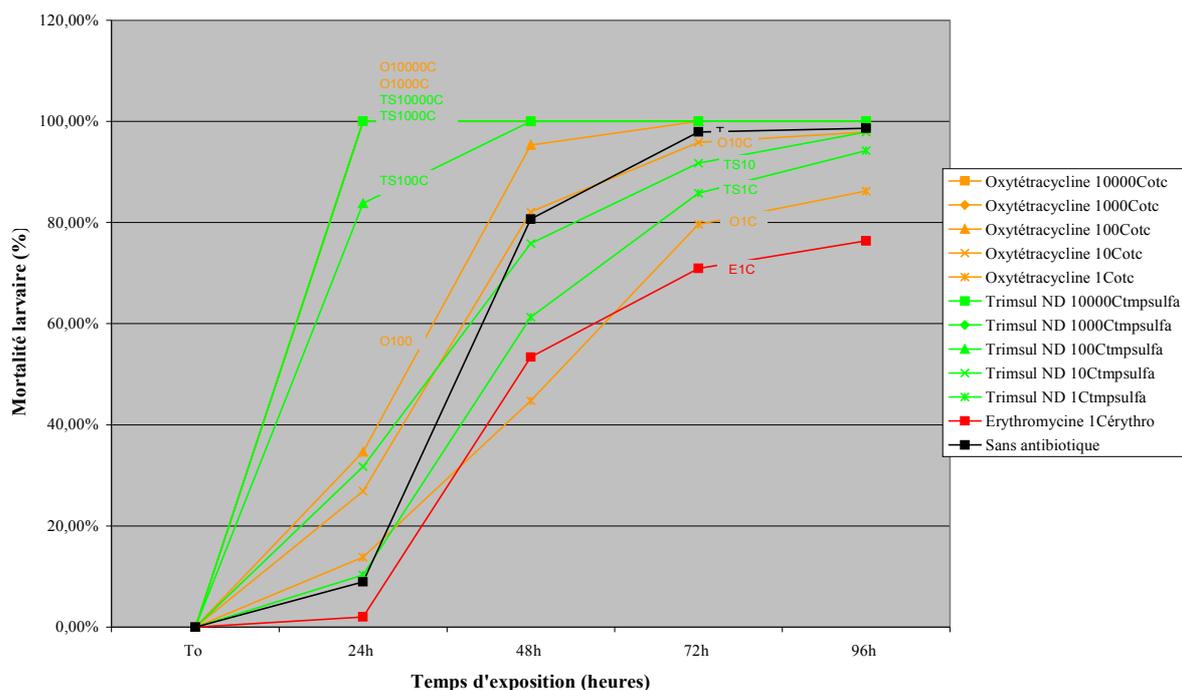
2.1.1 – Suivi des paramètres de milieu

- Le pH, l'oxygène dissous et la température de l'eau n'ont pas présenté de variations importantes au cours de la première série d'essais. Les conditions d'exposition sont donc valides et autorisent l'exploitation des autres résultats. Ces données sont décrites dans deux tableaux en annexe 4.

- Néanmoins, on peut dès à présent noter certaines valeurs de pH relevées à To au cours du premier essai sur les larves Zoé2. Ces valeurs très éloignées de celle du témoin « sans antibiotique » ($pH = 8,01$) ont été observées dans les bouteilles d'essai « Oxytétracycline 10000C_{otc} » ($pH = 1,57$) et « Trimsul ND 10000C_{tmpsulfa} » ($pH = 9,50$). Dans les essais suivants, la gamme de concentrations a été modifiée pour remédier à cette difficulté (Voir III Discussion).

2.1.2 – Suivi de la mortalité larvaire

- Premier essai sur les larves Zoé2 :

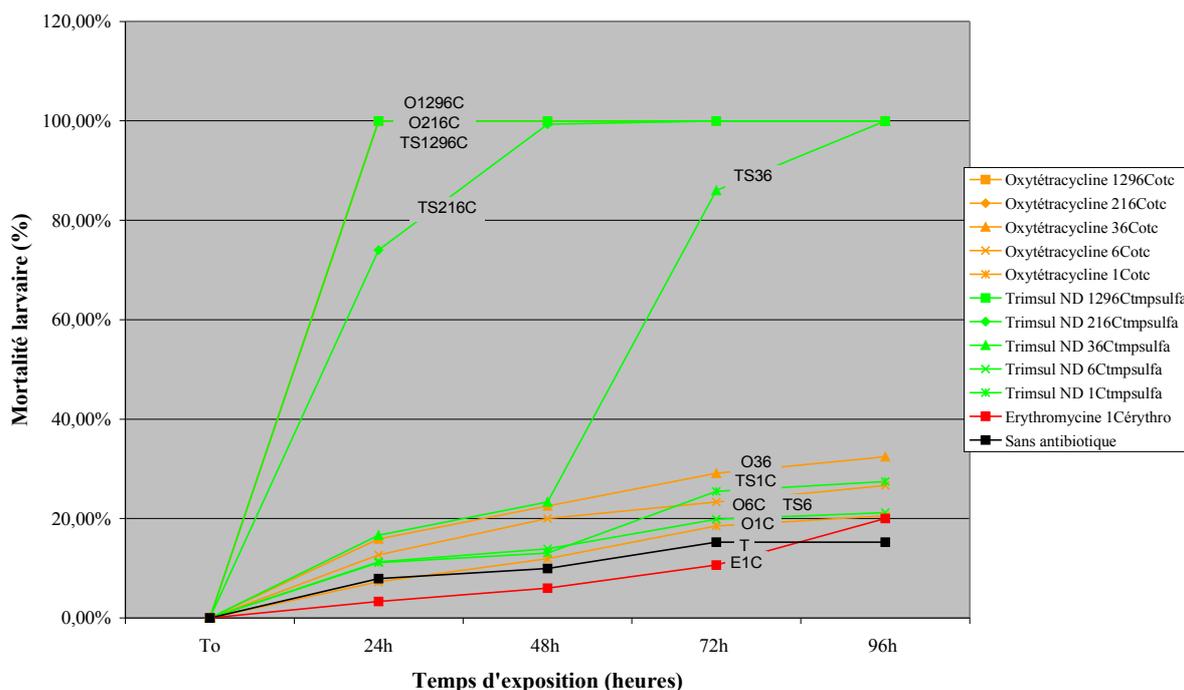


Graphe 3 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures

(premier essai avec les larves Zoé2)

La mortalité élevée dans toutes les bouteilles à 48, 72 et 96 heures au cours de l'essai Zoé2 de la première série suggère qu'un incident est survenu ou que les larves étaient de mauvaise qualité. Les résultats correspondant à cet essai sont donc présentés mais ne seront pas discutés. Pour cette même raison, la distribution des stades larvaires à la fin de l'essai n'a pas été menée.

• Premier essai sur les larves Mysis1 :



Graph 4 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (premier essai avec les larves Mysis1)

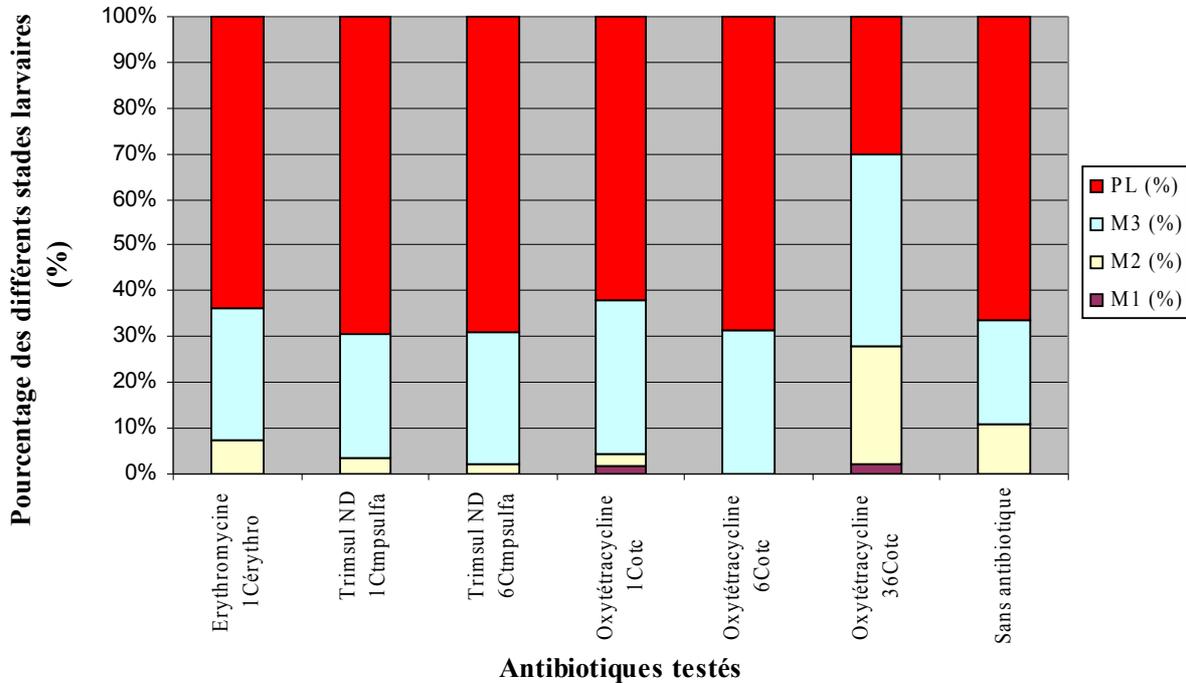
Au cours du premier essai sur les larves Mysis1, la mortalité à 24 heures augmente progressivement de 1C à 36C avec les antibiotiques testés mais reste inférieure à 17%. Elle atteint d'emblée 100% pour « Oxytétracycline 216C_{otc} » et 74% pour « Trimsul ND 216C_{tmpsulfa} ». Si on observe l'évolution de la mortalité sur 96 heures dans les bouteilles 1C, 6C et 36C, on constate :

- une augmentation de la mortalité dans « Trimsul ND 36C_{tmpsulfa} » à 48 heures pour rapidement atteindre 100% dans les heures qui suivent,
- une augmentation de la mortalité dans « Oxytétracycline 36C_{otc} » moins prononcée, avec 32,45% en fin d'essai,
- une mortalité que l'on qualifiera de « naturelle » dans les autres bouteilles, en regard de l'évolution de la mortalité dans la bouteille « Sans antibiotique ».

Il semble donc que l'oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 et 6C_{tmpsulfa} n'entraînent pas de hausse significative de la mortalité larvaire de J5 à J9.

2.1.3 – Distribution des stades larvaires en fin d’essai

La distribution des stades larvaires n’a pas été étudiée à la fin du premier essai sur les larves Zoé2. Les résultats à l’issue de l’essai sur les larves Mysis 1 sont présentés dans le graphe suivant.



Graphe 5 : distribution des stades larvaires à l’issue du premier essai sur les larves Mysis1

L’étude des stades larvaires à 96 heures montre des résultats comparables pour « Trimsul ND 1C_{tmpsulfa} », « Trimsul ND 6C_{tmpsulfa} », « Oxytétracycline 1C_{otc} », « Oxytétracycline 6C_{otc} », « Erythromycine 1C_{érythro} » et « Sans antibiotique ». On note un retard dans le passage des stades pour « Oxytétracycline 36C_{otc} ». Il semble donc que l’oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 et 6C_{tmpsulfa} n’entraînent pas de retard significatif dans le passage des stades larvaires de J5 à J9.

2.2 – Deuxième série d’essai :

2.2.1 - Suivi des paramètres de milieu

- Comme lors de la première série d’essais, les paramètres du milieu n’ont pas présenté de variations importantes. Les conditions d’exposition sont donc valides et autorisent l’exploitation des autres résultats. Ces données sont décrites dans deux tableaux en annexe 4

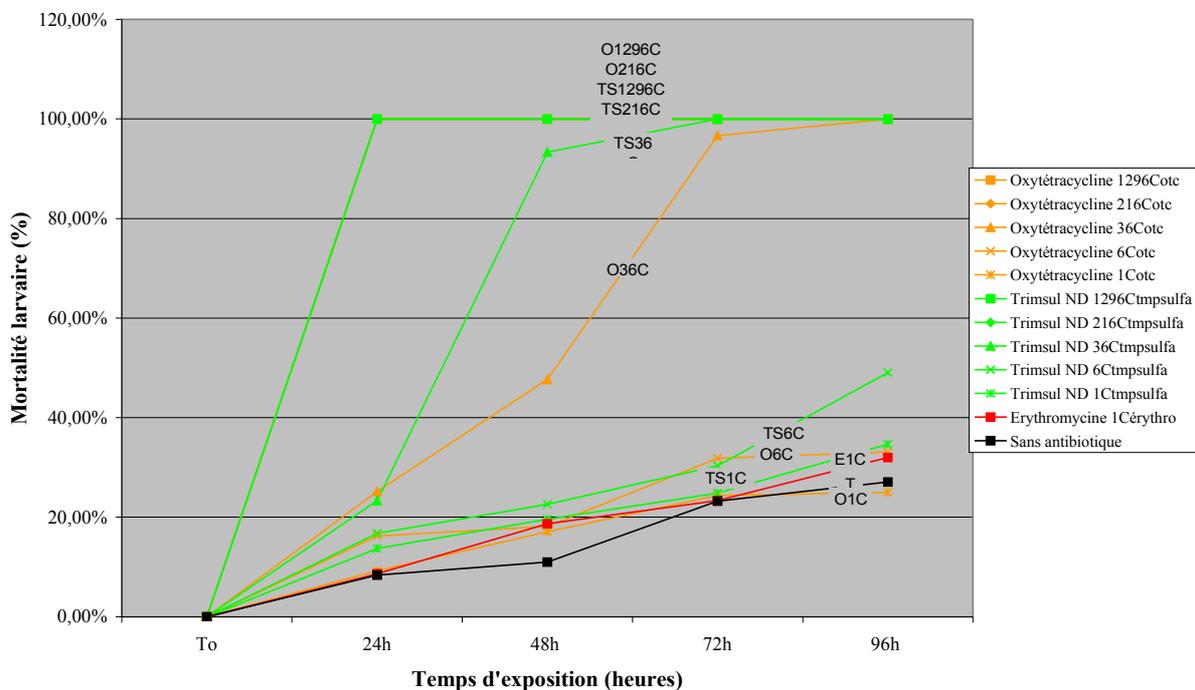
2.2.2 – Suivi de la mortalité larvaire

• Deuxième essai sur les larves Zoé2 :

Lors du second essai Zoé2, la mortalité à 24 heures augmente progressivement de 1C à 36C avec les antibiotiques testés puis atteint d'emblée 100% à 216C. Si on observe l'évolution de la mortalité sur 96 heures dans les bouteilles 1C, 6C et 36C, on constate :

- une augmentation de la mortalité dans « Oxytétracycline 36C_{otc} » et « Trimsul ND 36C_{tmpsulfa} » à 48 heures pour rapidement atteindre 100% dans les heures qui suivent,
- une augmentation de la mortalité à 96 heures dans « Trimsul ND 6C_{tmpsulfa} »,
- une mortalité que l'on qualifiera de « naturelle » dans les autres bouteilles, en regard de l'évolution de la mortalité dans la bouteille « Sans antibiotique ».

Il semble donc que l'oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 C_{tmpsulfa} n'entraînent pas de hausse significative de la mortalité larvaire de J3 à J7.



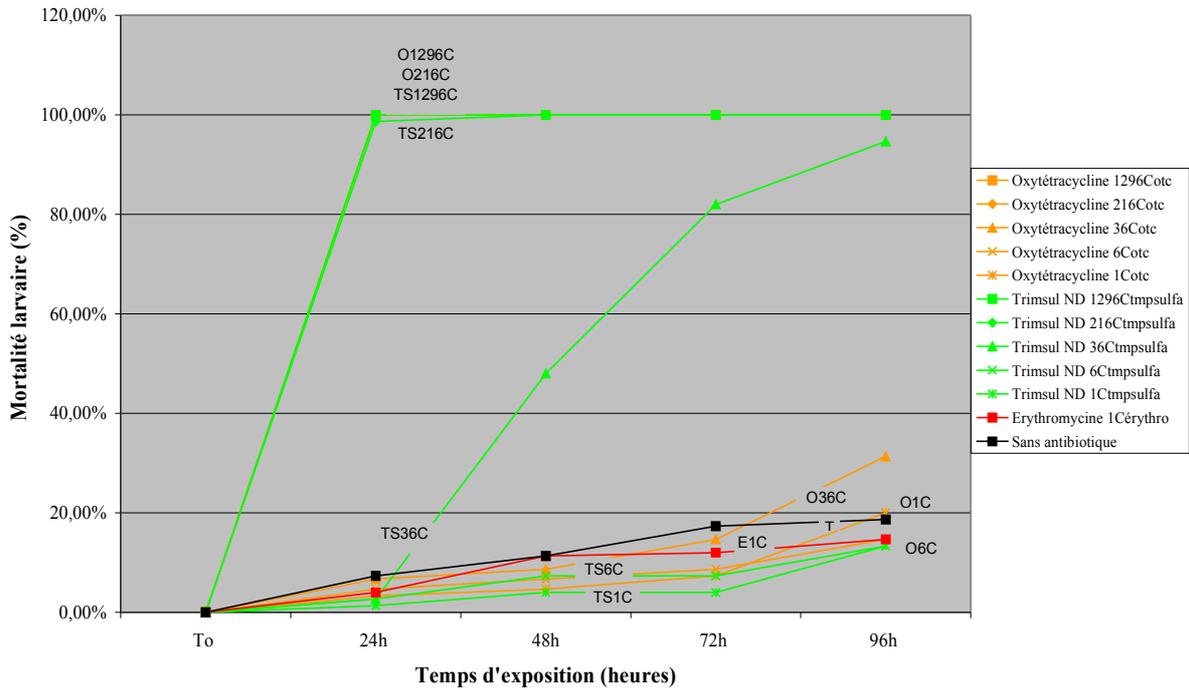
Graph 6 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (deuxième essai avec les larves Zoé2)

• Deuxième essai sur les larves Mysis1 :

Au cours du deuxième essai sur les larves Mysis1, la mortalité à 24 heures augmente progressivement de 1C à 36C avec les antibiotiques testés mais reste inférieure à 7%. Elle atteint d'emblée 100% pour « Oxytétracycline 216C_{otc} » et 98,67% pour « Trimsul ND 216C_{tmpsulfa} ». Si on observe l'évolution de la mortalité sur 96 heures dans les bouteilles 1C, 6C et 36C, on constate :

- une augmentation de la mortalité dans « Trimsul ND 36C_{tmpsulfa} » à 48 heures pour rapidement atteindre 100% dans les heures qui suivent,
- une augmentation de la mortalité dans « Oxytétracycline 36C_{otc} » moins prononcée, avec 31,33% en fin d'essai,
- une mortalité que l'on qualifiera de « naturelle » dans les autres bouteilles, en regard de l'évolution de la mortalité dans la bouteille « Sans antibiotique ».

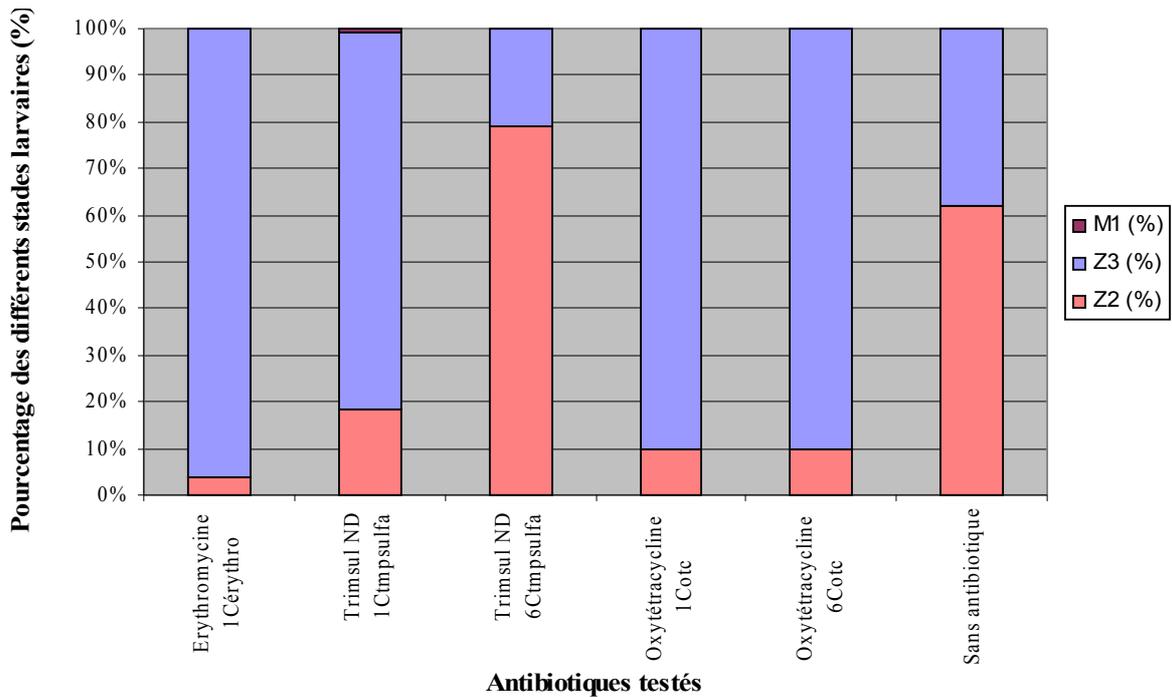
Il semble donc que l'oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 et 6C_{tmpsulfa} n'entraînent pas de hausse significative de la mortalité larvaire de J5 à J9.



Graph 7 : mortalité larvaire en fonction de la concentration d'antibiotique à 24, 48, 72, 96 heures (deuxième essai avec les larves Mysis1)

2.2.3 – Distribution des stades larvaires en fin d'essai

• Deuxième essai sur les larves Zoé2 :

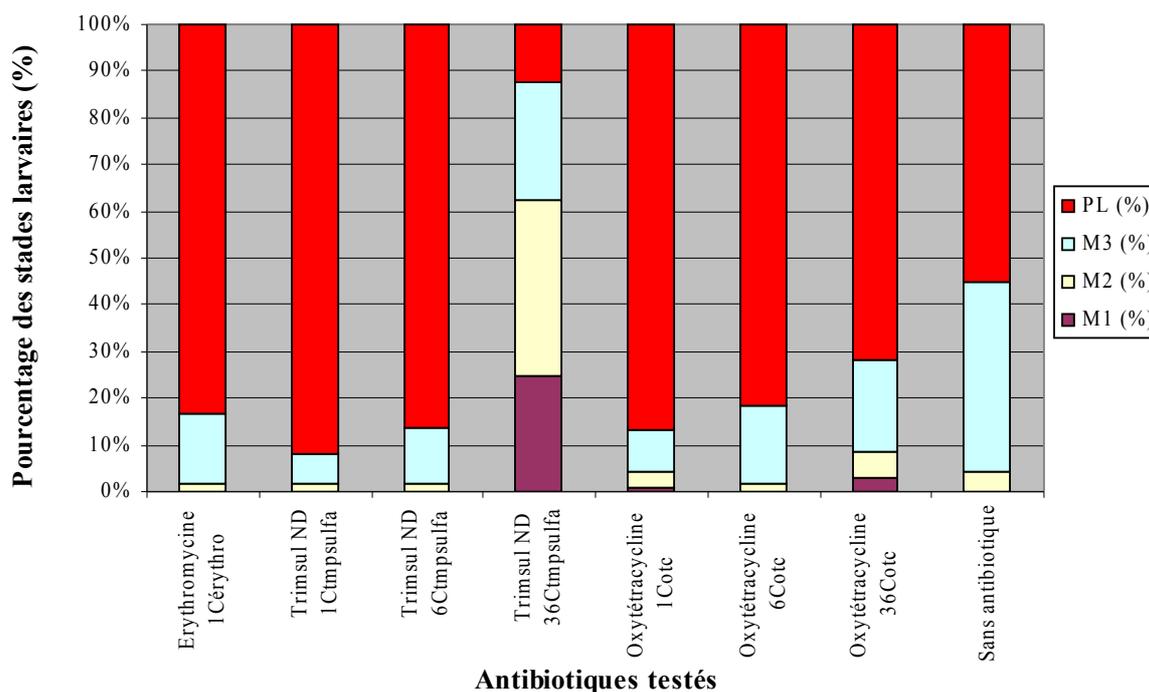


Graph 8 : distribution des stades larvaires à l'issue du second essai sur les larves Zoé2

L'étude des stades larvaires à 96 heures montre des résultats comparables pour « Oxytétracycline 1C_{otc} » et « Oxytétracycline 6C_{otc} », un peu meilleurs que pour « Trimsul ND 1C_{tmpsulfa} » (plus précoce, mais moins homogène dans sa distribution). On note un retard dans le passage des stades pour « Trimsul ND 6C_{tmpsulfa} » et « Sans antibiotique ». Enfin, « Erythromycine 1C_{érythro} » présente les meilleurs résultats.

Il semble donc que l'oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 C_{tmpsulfa} n'entraînent pas de retard significatif dans le passage des stades larvaires de J3 à J7.

• Deuxième essai sur les larves Mysis :



Graph 9 : distribution des stades larvaires à l'issue du second essai sur les larves Mysis1

L'étude des stades larvaires à 96 heures montre des résultats comparables pour « Trimsul ND 1C_{tmpsulfa} », « Trimsul ND 6C_{tmpsulfa} », « Oxytétracycline 1C_{otc} », « Oxytétracycline 6C_{otc} » et « Erythromycine 1C_{érythro} ». On note un retard dans le passage des stades pour « Trimsul ND 36C_{tmpsulfa} », « Oxytétracycline 36C_{otc} » et « Sans antibiotique ». Il semble donc que l'oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 et 6C_{tmpsulfa} n'entraînent pas de retard significatif dans le passage des stades larvaires de J5 à J9.

2.3 - Troisième série d'essai :

Effectuée en fin de stage, la troisième série s'appuie sur des essais menés sur 24 heures seulement, avec comme objectif la détermination de la CL50_{24h}. Les résultats de la première et de la deuxième série d'essais nous suggèrent le choix d'une nouvelle gamme de concentrations comprises entre 36C et 216C. Elle débute donc à 36C, puis suivent quatre concentrations espacées géométriquement avec une raison de 1,56.

2.3.1 - Suivi des paramètres de milieu sur 24 heures

• Comme lors des deux premières séries d'essais, les paramètres du milieu n'ont pas présenté de variations importantes. Les conditions d'exposition sont donc valides et autorisent l'exploitation des autres résultats. Ces données sont décrites dans deux tableaux en annexe 4

2.3.2 – Suivi de la mortalité larvaire sur 24 heures

• Troisième essai sur les larves Zoé2 :

La mortalité dans le groupe témoin « Sans antibiotique » est de 8%, et il existe plus de trois points compris entre 5 et 95% de mortalité avec chaque antibiotique, la détermination de la CL50_{24h} par la méthode log-probit est donc réalisable.

Tableau XIV : suivi de la mortalité larvaire lors du troisième essai d'innocuité mené sur les larves Zoé2 du LAC Saint-Vincent

Substances d'essai	Dose (mg/L)	Nombre de larves d'essai	Mortalité à 24 heures	Mortalité (probit) à 24 heures
Oxytétracycline 213,21C _{otc}	1066,03	151	151 (100%)	7,576
Oxytétracycline 136,67C _{otc}	683,35	149	71 (47,65%)	4,9375
Oxytétracycline 87,61C _{otc}	438,05	152	36 (23,68%)	4,278
Oxytétracycline 56,16 _{otc}	280,80	153	20 (13,07%)	3,874
Oxytétracycline 36C _{otc}	180	150	8 (5,33%)	3,402
Trimsul ND 213,21C _{tmpsulfa}	2132,07	153	80 (52,29%)	5,0675
Trimsul ND 136,67C _{tmpsulfa}	1366,71	152	28 (18,42%)	4,104
Trimsul ND 87,61C _{tmpsulfa}	876,10	152	22 (14,47%)	3,942
Trimsul ND 56,16 _{tmpsulfa}	561,60	150	11 (7,33%)	3,56
Trimsul ND 36C _{tmpsulfa}	360	148	7 (4,73%)	3,305
Erythromycine 1C _{érythro}	2	149	11 (7,38%)	3,56
Sans antibiotique	0	150	12 (8%)	3,595

Plus forte concentration d'oxytétracycline ne provoquant aucune mortalité durant l'essai : /

Plus forte concentration de Trimsul ND ne provoquant aucune mortalité durant l'essai : /

Plus faible concentration d'oxytétracycline provoquant 100% de mortalité durant l'essai : /

Oxytétracycline 213,21C_{otc} (1066,03mg/L)

Plus faible concentration de Trimsul ND provoquant 100% de mortalité durant l'essai : /

Incidents survenus au cours de l'essai : /

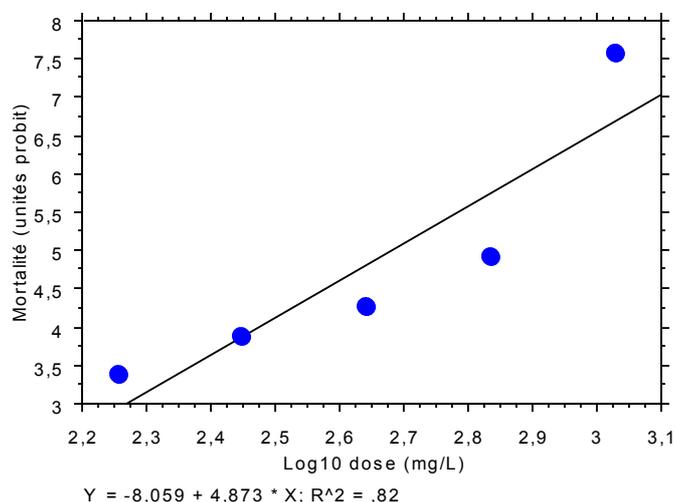
Réponses anormales des larves de crevettes : /

• Troisième essai sur les larves Mysis1 :

Nous n'avons pas réussi à obtenir un lot homogène de larves Mysis1 pour effectuer cet essai. De fait, les résultats obtenus avec un mélange de larves Zoé2, Zoé3 et Mysis1 ne seront ni exposés ni discutés dans ce document, car ils n'apportent pas les informations recherchées dans cet essai d'innocuité.

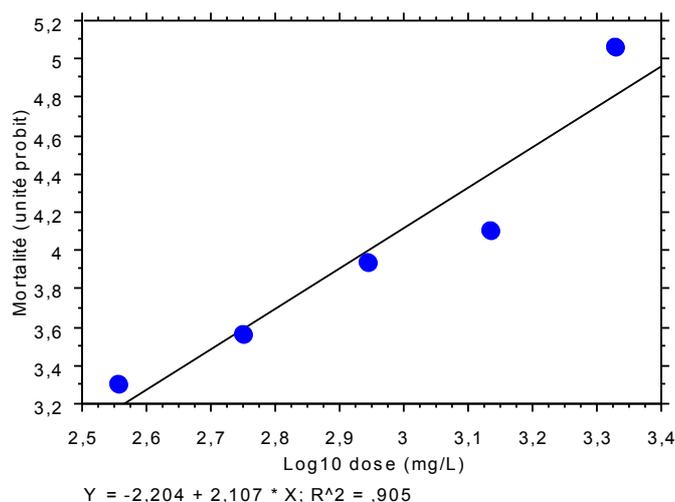
2.3.3 - Droites « mortalité à 24 heures en fonction de la dose » après transformation log-probit »

- Troisième essai sur les larves Zoé2 :



Graphe 10 : transformation log-probit et mortalité à 24h des larves Zoé2 avec l'oxytétracycline

On peut tout d'abord noter que la mortalité à 24 heures de la bouteille « Oxytétracycline 36C_{otc} » est basse au cours de cet essai (5,33%), comparativement à celle observée au cours de la deuxième série (25,17%), (Tableaux XIX et XXIII). Par ailleurs, la droite de régression d'équation $Y = -8,059 + 4,873 * X$ présente un coefficient $R^2 = 0,82$, trop éloigné de 1 pour que l'on puisse de façon fiable utiliser cette équation pour le calcul de la CL50. On se limitera donc à encadrer la CL50_{24h} de l'oxytétracycline sur les larves Zoé2 à l'aide des résultats de la seconde série d'essais.



Graphe 11 : transformation log-probit et mortalité à 24h des larves Zoé2 avec le Trimsul ND

On peut également noter que la mortalité à 24 heures de la bouteille « Trimsul ND 36C_{tmpsulfa} » est basse au cours de cet essai (3,31%), comparativement à celle observée au cours de la deuxième série (23,33%). (Tableaux XIX et XXIII). La droite de régression d'équation $Y = -2,204 + 2,107 * X$, présente un coefficient $R^2 = 0,905$, satisfaisant pour le calcul de la CL50. En reportant $Y = 5$ (5 unités probit soit 50% de mortalité cumulée) dans l'équation, on obtient $X = 3,419$ qui correspondrait à une CL50_{24h} de 2624,70mg/L. Une nouvelle série d'essai serait nécessaire pour valider cette estimation de la CL50_{24h}, on se limitera donc à encadrer la CL50_{24h} du trimsul ND sur les larves Zoé2 à l'aide des résultats de la seconde et de la troisième série d'essais.

- Troisième essai sur les larves Mysis1 :

Nous n'avons pas réussi à obtenir un lot homogène de Mysis1 pour effectuer cet essai. Les résultats obtenus ne sont pas exploitables pour déterminer les CL50_{24h}. Ils ne seront donc ni exposés ni discutés dans ce document. On se limitera à encadrer les CL50_{24h} à l'aide des résultats de la seconde série d'essais.

III - DISCUSSION

3.1 - Modifications apportées à la gamme de concentrations d'essai :

- La préparation d'une épreuve de toxicité aiguë débute en général par une recherche bibliographique visant à définir la gamme de concentrations de toxique qui sera testée. Il n'existe jusqu'à présent que deux parutions qui traitent de la toxicité d'antibiotiques sur les larves de crevettes [2] [24]. Les méthodes employées dans ces deux articles sont assez différentes de la nôtre et par conséquent on ne peut s'appuyer sur les gammes de concentrations que proposent leurs auteurs. Par ailleurs, il nous a semblé judicieux de caractériser plus finement les éventuels effets toxiques qui pourraient survenir aux concentrations usuelles de traitement.

- En première approche, la gamme choisie débute donc à 1C, puis suivent quatre concentrations espacées en une suite géométrique. La raison 10 initialement prévue dans la méthode a été remplacée par une raison 6 après le premier essai sur les larves Zoé2. La limite haute 10000C paraît inadaptée pour décrire la toxicité des antibiotiques, le pH relevé dans la bouteille d'essai « Oxytétracycline 10000C_{otc} » étant de 1,57 et celui de la bouteille « Trimsul ND 10000C_{tmpsulfa} » étant de 9,50, valeurs très éloignées du pH du témoin « sans antibiotique » qui est de 8,01. La mortalité à 24 heures dans les bouteilles d'essai 10000C traduit plus un « effet pH » que la toxicité des antibiotiques, d'où le choix d'une raison 6 qui déplace la limite haute de la gamme de concentrations à 1296C.

- Les deux premières séries d'essais permettent d'étudier la toxicité aiguë des antibiotiques aux faibles concentrations et de recadrer la gamme de concentrations pour la détermination de la CL50 lors de la troisième série d'essais. Les résultats de la première et de la deuxième série d'essais nous suggèrent le choix d'une nouvelle gamme de concentrations comprises entre 36C et 216C. Elle débute donc à 36C, puis suivent quatre concentrations espacées géométriquement avec une raison de 1,56.

3.2 – Sécurité d’emploi des antibiotiques aux concentrations usuelles de traitement :

- En s’appuyant sur les résultats de deux premiers essais menés sur les larves Zoé2, il apparaît que l’oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 C_{trimsulfa} n’entraînent pas de hausse significative de la mortalité larvaire ni de retard significatif dans le passage des stades larvaires de J3 à J7.
- En s’appuyant sur les résultats de deux premiers essais menés sur les larves Zoé2, il apparaît que l’oxytétracycline à 1 et 6 C_{otc} et le Trimsul ND à 1 et 6C_{trimsulfa} n’entraînent pas de hausse significative de la mortalité larvaire ni de retard significatif dans le passage des stades larvaires de J5 à J9.

Dans le cadre particulier de ces essais expérimentaux (administration unique d’antibiotique, petit volume de 1 L, absence d’*Artemia salina*), les antibiotiques choisis semblent donc garantir une sécurité d’emploi aux concentrations usuelles de traitement.

3.3 – Détermination des CL50 :

- Il n’existe à l’heure actuelle qu’une étude traitant de la toxicité aiguë des antibiotiques sur les larves de crevettes avec la recherche des CL50 [24]. La méthode diffère quelque peu de celle que nous avons employée avec une densité de 30 larves par litre au lieu de 150. Il est donc difficile de comparer les estimations des CL50_{24h} obtenues dans les deux études.
- En s’appuyant sur les résultats des trois premières séries d’essai, il est seulement possible de proposer un encadrement des CL50_{24h}. Deux séries d’essais supplémentaires utilisant la nouvelle gamme de concentrations de raison 1,56 seraient nécessaires pour obtenir de meilleures estimations. La première série permettrait de proposer des valeurs de CL50_{24h}, la seconde série permettrait de les valider.

Tableau XV : encadrement des CL50_{24h} du chlorhydrate d’oxytétracycline et du Trimsul ND pour les stades larvaires de *Litopenaeus stylirostris* étudiés

Stades larvaires	Antibiotiques	CL50_{24h} (mg/L)
Zoé2	oxytétracycline	180 < CL50 _{24h} < 1080
	trimsul ND	360 < CL50 _{24h} < 2624,70
Mysis1	oxytétracycline	180 < CL50 _{24h} < 1080
	trimsul ND	360 < CL50 _{24h} < 2160

S’il l’on recherche à élargir le propos à d’autres organismes aquatiques, on note que les tétracyclines sont considérées comme peu toxiques pour les micro – algues *Microcystis aeruginosa* et *Selenastrum capricornutum* [9], pour le crustacé *Daphnia magna* [25] et pour le poisson *Salvelinus namaycush* (CL50_{24h} de l’oxytétracycline de 840mg/L) [16]. La sulfadiazine est également considérée comme faiblement toxique pour le crustacé *Daphnia magna* [25]

IV – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

• Lors d'une administration unique, l'oxytétracycline à $1C_{otc}$ et le Trimsul ND à $1C_{tmsulfa}$ ne provoquent pas de mortalité larvaire ni de retard significatif dans le passage des stades larvaires. Leurs $CL50_{24h}$, même s'il ne s'agit que d'encadrements, sont élevées. L'oxytétracycline et le trimsul ND semblent donc être de bons candidats. Il reste à vérifier leur emploi en conditions réelles d'élevage avec une administration réitérée et la présence de nauplii d'*Artemia salina*.

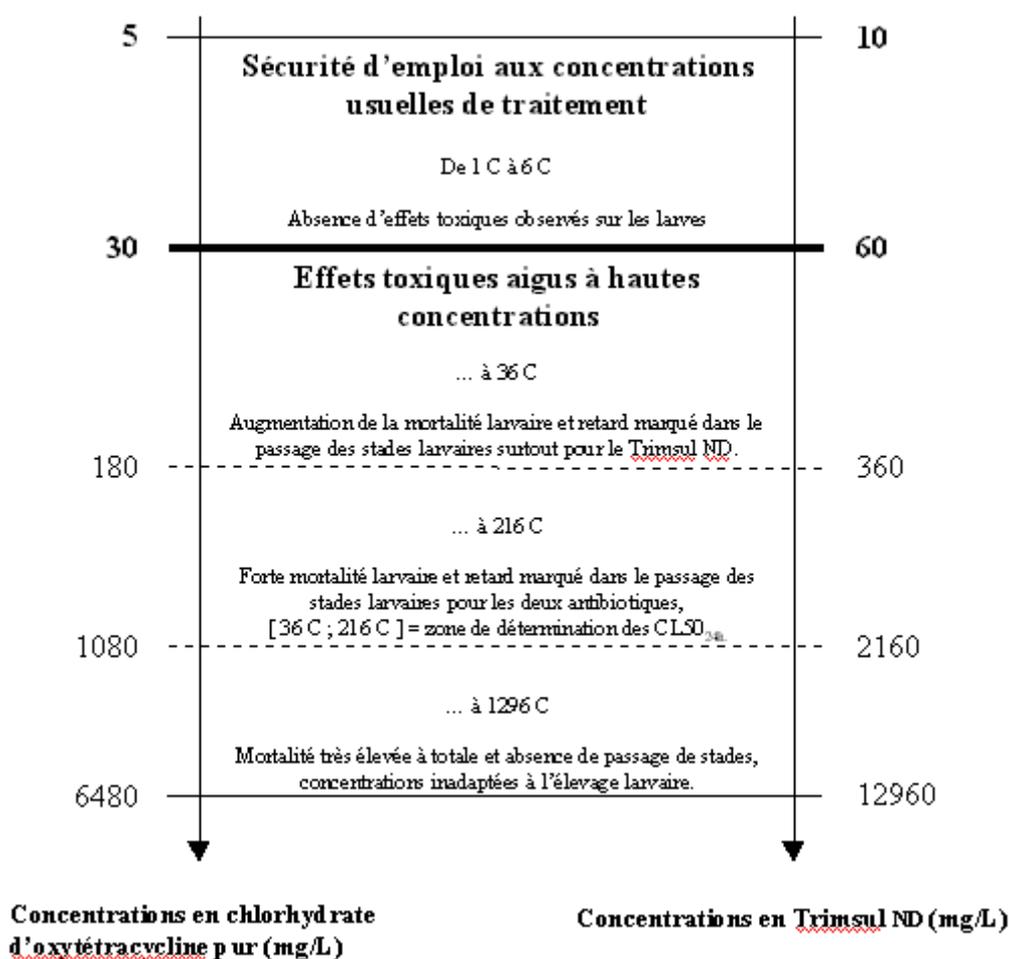


Figure 22 : innocuité des antibiotiques de substitution vis-à-vis des larves de *Litopenaeus stylirostris*

• Une question reste en suspens : le premier changement d'eau ayant lieu à J9, existe-t-il un phénomène d'accumulation de l'antibiotique au fur et à mesure des traitements successifs qui pourrait provoquer d'éventuels effets toxiques ? La réponse à cette question est difficile. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse d'accumulation en effectuant un dosage des antibiotiques dans l'eau d'élevage aux différents temps de traitement par une technique performante, telle que la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Il serait ainsi possible de comparer les concentrations trouvées dans le milieu d'élevage avec les concentrations testées dans cette étude d'innocuité.

Efficacité

- Les essais se sont déroulés sur trois productions à l'écloserie du LAC Saint-Vincent. Pour des raisons de planning, les deux premières productions ont eu lieu avant la détermination de la concentration C. C'est donc en s'appuyant sur les travaux de Dominique PHAM et de précédents stagiaires que des premiers protocoles ont été proposés puis testés.

I – MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Les traitements sont effectués dans des bacs cylindro-coniques de 150 litres (scobs) pour les essais en petits volumes et des bacs de 2 et 5 m³ pour les essais en grands volumes. Les bacs sont remplis d'eau de mer à 29°C avec 5 g/m³ d'EDTA, puisensemencés avec 150 à 200 nauplii par litre. Hormis les traitements antibiotiques, l'élevage larvaire est mené conformément à ce qui se fait d'habitude au LAC Saint-Vincent. La survie larvaire est estimée quotidiennement par échantillonnage dans chaque bac et les stades larvaires sont déterminés au stéréo-microscope.

- A l'occasion de la première production, de nouveaux essais sont effectués sur le Tribriksen ND pour achever les travaux du stagiaire de Merlaut (2001). Disponible en plus grand conditionnement et à un tarif plus intéressant que le Tribriksen ND, seule la spécialité pharmaceutique australienne Trimsul ND sera testée lors des deux productions suivantes. Le chlorhydrate d'oxytétracycline pur fait aussi l'objet de tests au cours des trois productions. Enfin, l'érythromycine en tant que protocole de référence et un témoin sans antibiotique sont également testés.

- Le matériel et les consommables nécessaires pour chaque essai d'efficacité sont décrits en annexe 5.

1.1 - Protocoles testés au cours de la production 0303 :

- Des prélèvements d'eau sont effectués quotidiennement dans des tubes stériles de 20 mL pour les suivis bactériens réalisés au laboratoire de pathologie (un échantillon par scob de 150 L avec tirage au sort entre les trois exemplaires, un échantillon par bac de 2 m³). Ces suivis bactériens ne sont menés que pendant la première production. Le matériel, les consommables et la méthode employée pour le traitement de ces prélèvements sont décrits en annexe 5.

- L'essai en petits volumes est l'occasion de tester pour la première fois les antibiotiques de substitution. Les protocoles proposés sont inspirés de tests menés au LAC Saint-Vincent et dans les écloséries privées.

Tableau XVI : protocoles testés en petits volumes 150 L lors de la production 0303

Antibiotiques testés	Protocole	Changements d'eau
Sans antibiotique (trois scobs)	/	Classique 50% à J9, J11, J14, J15, J16, J17, J18, J19 75% à J13
Érythromycine (trois scobs)	2 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique
Tribrissen ND (trois scobs) triméthoprime – sulfadiazine	10 mL/m ³ /j de J3 à J9 compris	Classique
Oxytétracycline 1 (trois scobs)	5 g/m ³ à J3, J9, J13 1,5 g/m ³ à J5, J7, J11	Montagnès 1 100% à J9, J11, J13, J15, J17
Oxytétracycline 2 (trois scobs)	5 g/m ³ à J3, J9, J11 2 g/m ³ à J4, J6 7 g/m ³ à J13	Montagnès 2 100% à J9, J11, J13, J16
Oxytétracycline 3 (trois scobs)	4 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique
Trimsul ND 1 (trois scobs) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ /j de J3 à J9 compris	Classique
Trimsul ND 2 (trois scobs) triméthoprime – sulfadiazine	20 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique
Trimsul ND 3 (trois scobs) triméthoprime – sulfadiazine	5 g/m ³ /j de J3 à J9 compris	Classique
Trimsul ND 4 (trois scobs) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique

- L'essai en grands volumes a pour objet de valider les tests en petits volumes réalisés dans le travail de Merlaut [18].

Tableau XVII : protocoles testés en grands volumes 2 m³ lors de la production 0303

Antibiotiques testés	Protocole	Changements d'eau
Sans antibiotique (un bac)	/	Classique
Érythromycine (un bac)	2 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique
Tribrissen ND (trois bacs) triméthoprime – sulfadiazine	10 mL/m ³ /j de J3 à J9 compris.	Classique

1.2 - Protocoles testés au cours de la production 0304 :

- L'approvisionnement moindre en nauplii lors de la seconde production n'a permis qu'un essai en petits volumes. Les protocoles testés sont ceux qui nous ont semblé les plus prometteurs au cours de la première production.

Tableau XIII : protocoles testés en petits volumes 150 L lors de la production 0304

Antibiotiques testés	Protocole	Changements d'eau
Sans antibiotique (trois scobs)	/	Classique
Érythromycine (trois scobs)	2 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique
Oxytétracycline 1 (trois scobs)	5 g/m ³ à J3, J9, J13 1,5 g/m ³ à J5, J7, J11	Montagnès 1 100% à J9, J11, J13, J15, J17
Oxytétracycline 2 (trois scobs)	5 g/m ³ à J3, J9, J11 2 g/m ³ à J4, J6 7 g/m ³ à J13	Montagnès 2 100% à J9, J11, J13, J16
Trimsul ND (trois scobs) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ /j de J3 à J9 compris	Classique

1.3 - Protocoles testés au cours de la production 0305 :

- L'essai en petits volumes s'appuie sur la concentration C_{tmpsulfa} , en tenant compte des changements d'eau :
 - « Trimsul ND 1 » présente une dose d'attaque à J3 correspondant à $1C_{\text{tmpsulfa}}$, puis des doses intermédiaires égales à $1/2 C_{\text{tmpsulfa}}$ les jours où 50% de l'eau est changée, $3/4 C_{\text{tmpsulfa}}$ quand 75% de l'eau est changée,
 - « Trimsul ND 2 » s'appuie sur les essais de G. Merlaut qui montraient des résultats assez similaires entre le Tribriessen ND à 10 mL/m³/j de J3 à J9 compris (équivalent à 10 g/m³/j de Trimsul ND) et le Tribriessen ND à 8 mL/m³/j de J3 à J9 compris (équivalent à 8 g/m³/j de Trimsul ND), en conservant le concept de dose d'attaque et de doses intermédiaires,
 - « Trimsul ND 3 » est l'occasion de tester à nouveau ce protocole qui avait donné des résultats moyens en terme de survie larvaire, mais bons en terme de passage de stades lors de la première production.

Tableau XIX : protocoles testés en petits volumes 150 L lors de la production 0305

Antibiotiques testés	Protocole	Changements d'eau
Trimsul ND 1 (quatre scobs) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ à J3 5 g/m ³ à J4, J5, J6, J7, J8 7,5 g/m ³ à J9	Classique
Trimsul ND 2 (quatre scobs) triméthoprime – sulfadiazine	8 g/m ³ à J3 4 g/m ³ à J4, J5, J6, J7, J8 6 g/m ³ à J9	Classique
Trimsul ND 3 (quatre scobs) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique

- L'essai en grands volumes a pour objet de valider les essais en petits volumes de la seconde et de la troisième production.

Tableau XX : protocoles testés en grands volumes 2 m³ lors de la production 0305

Antibiotiques testés	Protocole	Changements d'eau
Oxytétracycline (deux bacs)	5 g/m ³ à J3, J9, J11, J13 1,5 g/m ³ à J5, J7	Montagnès 1 100% à J9, J11, J13, J15, J17
Trimsul ND 1 (deux bacs) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ à J3 5 g/m ³ à J4, J5, J6, J7, J8 7,5 g/m ³ à J9	Classique
Érythromycine (un bac)	2 g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Classique

Tableau XXI : protocoles testés en grands volumes 3 et 4 m³ lors de la production 0305

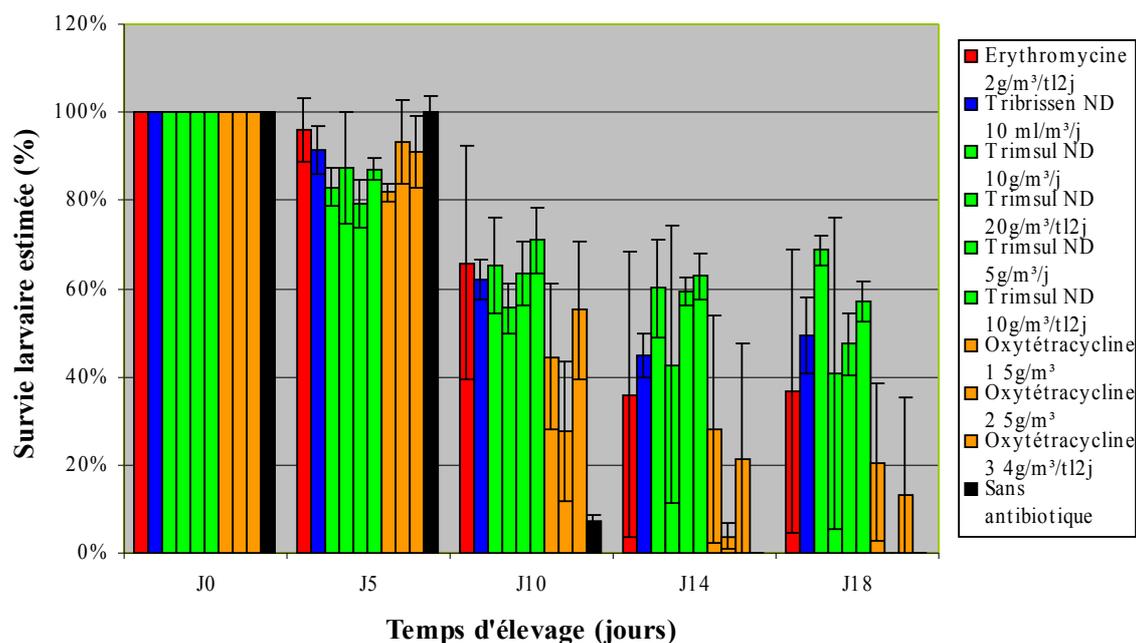
Antibiotiques testés	Protocole	Changements d'eau
Oxytétracycline (un bac 4 m ³)	5 g/m ³ à J3, J9, J11, J13 1,5 g/m ³ à J5, J7	Montagnès 100% à J9, J11, J13, J15, J17
Trimsul ND 1 (un bac 3 m ³) triméthoprime – sulfadiazine	10 g/m ³ à J3 5 g/m ³ à J4, J5, J6, J7, J8 7,5 g/m ³ à J9	Classique

II - RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 - Résultats et discussion de la production 0303 :

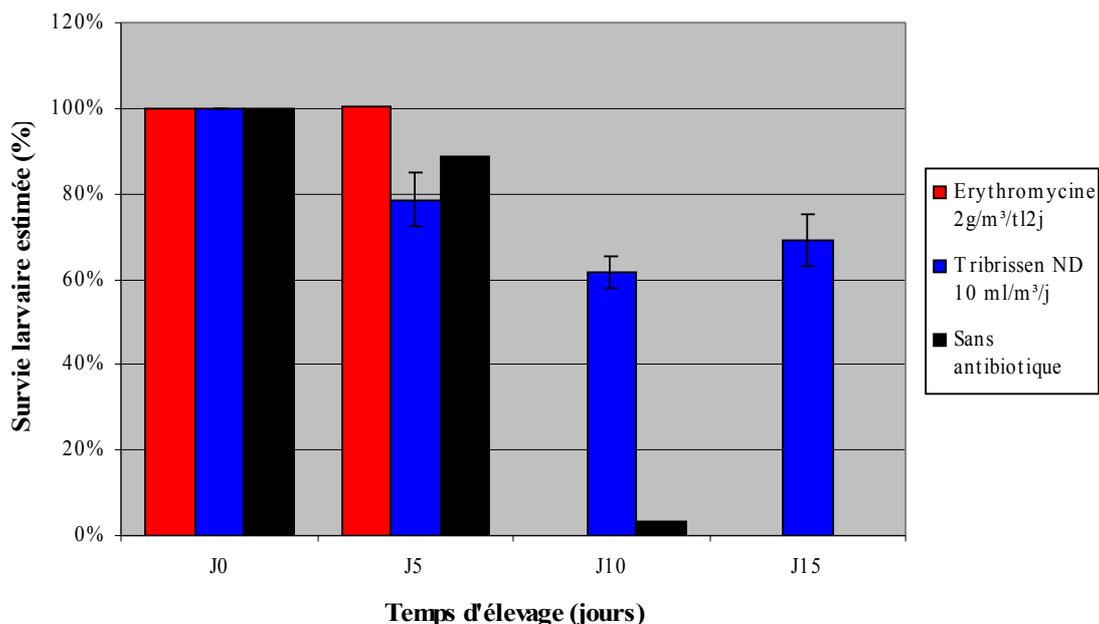
2.1.1 – Survie larvaire estimée

• Les différents scobs de 150 L présentent des survies larvaires comparables jusqu'à J5. À partir de J10, une baisse notable de la survie larvaire apparaît chez le témoin négatif « Sans antibiotique » et les protocoles « Oxytétracycline1 5g/m³ » (un scob sur trois), « Oxytétracycline2 5g/m³ » (deux scobs sur trois), et « Oxytétracycline3 4g/m³/tl2j » (un scob sur trois). L'hypothèse d'une mauvaise qualité des micro-particules qui expliqueraient les piètres résultats des protocoles à base d'oxytétracycline a été avancée. Toutefois, on peut objecter que toutes les larves d'essai ont été nourries avec les mêmes aliments. De J14 jusqu'à la pêche à J18, les protocoles s'appuyant sur le Trimsul ND et le Tribissen ND montrent les meilleurs résultats, dépassant même le témoin positif « Érythromycine 2g/m³/tl2j ». Un protocole attire plus particulièrement notre attention, il s'agit de « Trimsul ND 1 10g/m³/j ». Ses très bons résultats observés sur les trois scobs nous ont incité à tester prioritairement ce protocole lors de la deuxième production 0304.



Graph 12 : survie larvaire estimée dans les scobs de 150 L à J5, J10, J14, J18 lors de la production 0303

• A partir de J8, le témoin négatif « Sans antibiotique » en bac de 2 m³ a évolué pareillement qu'en petits volumes. Malheureusement, le témoin positif « Érythromycine 2g/m³/t12j » a suivi la même évolution et la décision a été prise de le vider à J10. Les résultats de « Tribrisse ND 10ml/m³/j » en bacs de 2 m³ semblent prometteurs, mais sans élément de comparaison il est difficile de conclure. Précisons toutefois qu'avec 62%, 72% et 74% à J15, les survies larvaires estimées des trois bacs de 2 m³ traités au Tribrisse ND sont comparables -voire supérieures- à ce que l'on observe dans un élevage normal utilisant l'érythromycine.

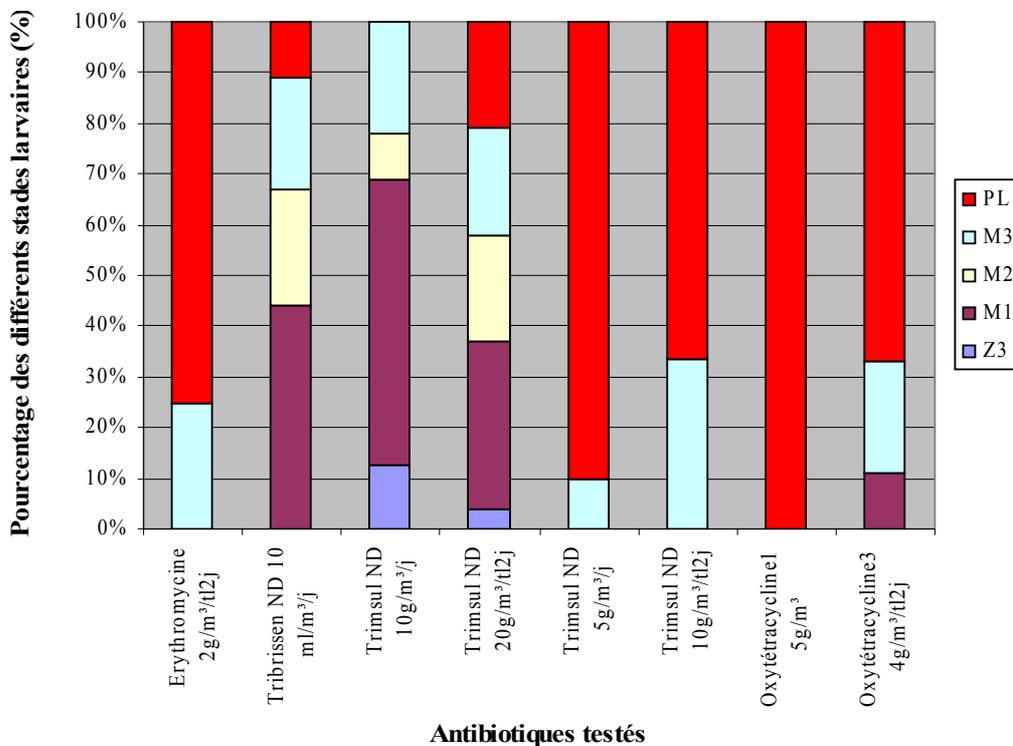


Graph 13 : survie larvaire estimée en bacs de 2 m³ à J5, J10, J15 lors de la production 0303

2.1.2 – Distribution des stades larvaires

• Le bon passage des stades larvaires est suivi quotidiennement. Une attention plus soutenue est observée lors des transitions Zoé3-Mysis1, Mysis3-Postlarve et en fin d'élevage larvaire où l'on détermine les formules rostrales avant le passage en nurserie. On entend par formule rostrale le nombre de dents présentes au-dessus et en dessous du rostre des post-larves. Il a été décidé d'observer plus particulièrement la transition Mysis3-Postlarve lors de l'essai en scobs de 150 L.

Les protocoles « Oxytétracycline1 5g/m³ », « Trimsul ND 3 5g/m³/j », « Trimsul ND 4 10g/m³/tl2j », « Oxytétracycline3 4g/m³/tl2j » semblent les plus intéressants sur le plan du passage des stades larvaires. Par contre « Trimsul ND 1 10g/m³/j », « Tribriessen ND 10 ml/m³/j », « Trimsul ND 20g/m³/tl2j » semblent inappropriés pour mener un élevage dans un temps raisonnable, puisqu'ils s'accompagnent d'un retard non négligeable dans le passage des stades larvaires. Toutefois, le protocole « Trimsul ND 1 10g/m³/j » demeure très intéressant par la valeur élevée et homogène de la survie larvaire observée. Le test de ce protocole est donc maintenu, en espérant de meilleurs résultats pour le passage des stades larvaires.

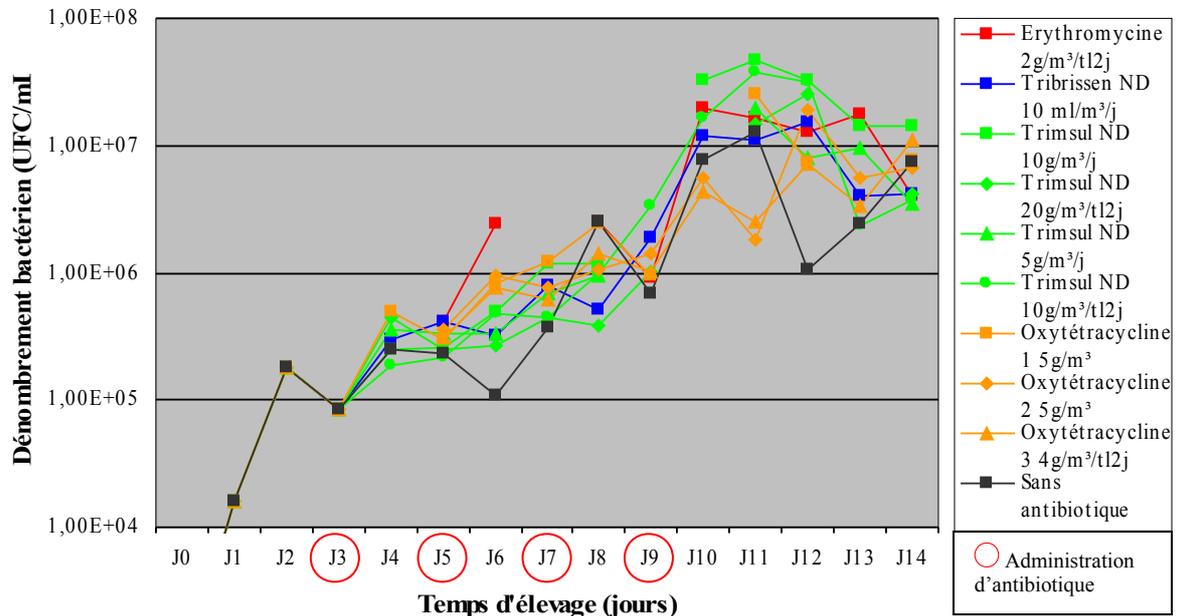


Graph 14 : distribution des stades larvaires à J13 dans les scobs de 150 L lors de la production 0303

2.1.3 Dénombrements bactériens

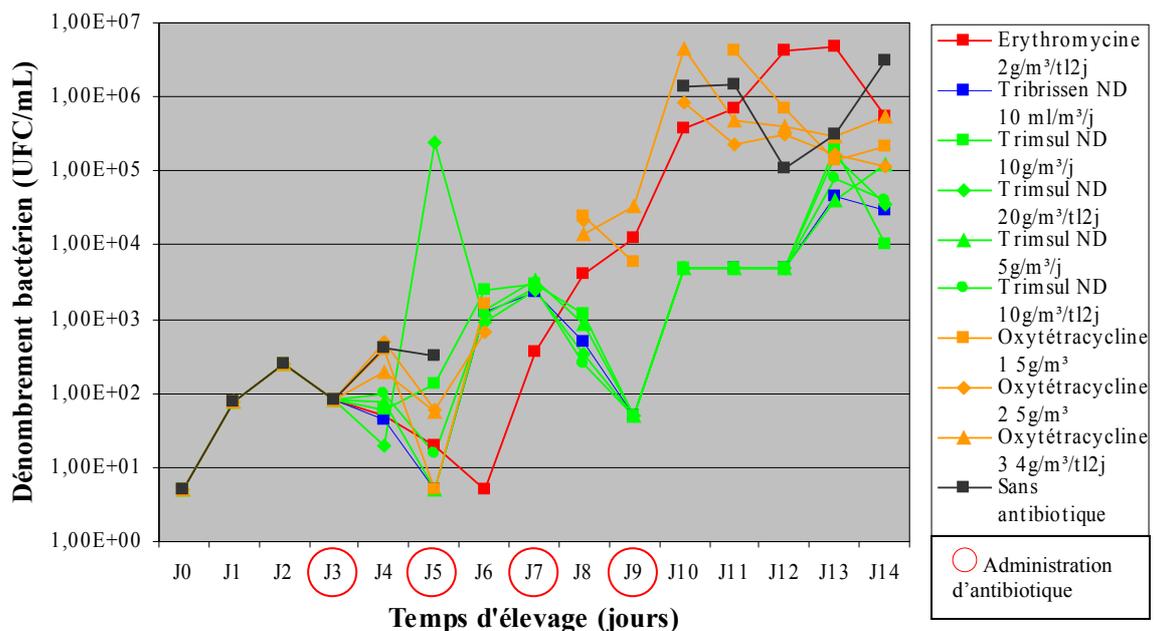
En observant les quatre graphiques, on peut noter tout d'abord noter un accroissement important des effectifs bactériens dès J2. Ce phénomène semble plus prononcé après J4, ce qui tendrait à confirmer l'introduction de bactéries avec l'ajout d'*Artemia* dans la séquence alimentaire. Il n'a pas été observé d'augmentation globale du nombre des types de colonies différents sur gélose.

• Le premier graphique présente les aptitudes assez comparables des différents protocoles à maîtriser le développement de la flore hétérotrophe totale dans les scobs de 150 L. Le développement des populations bactériennes paraît similaire avec et sans antibiotique.



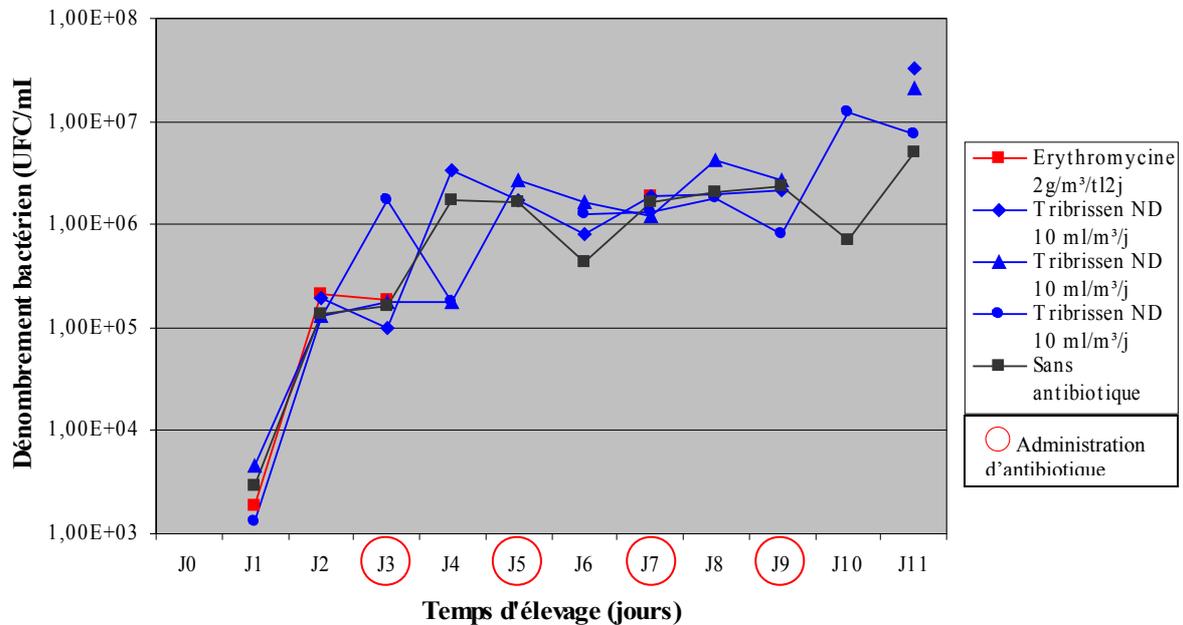
Graph 15 : suivi de la flore hétérotrophe totale dans les scobs de 150 L

• Le deuxième graphique montre que le Tribissen ND et le Trimsul ND semblent plus à même de contrôler l'évolution de la flore Vibronacée dans les scobs de 150 L. Viennent ensuite l'oxytétracycline et l'érythromycine. D'autres essais seraient nécessaires pour confirmer cette tendance.



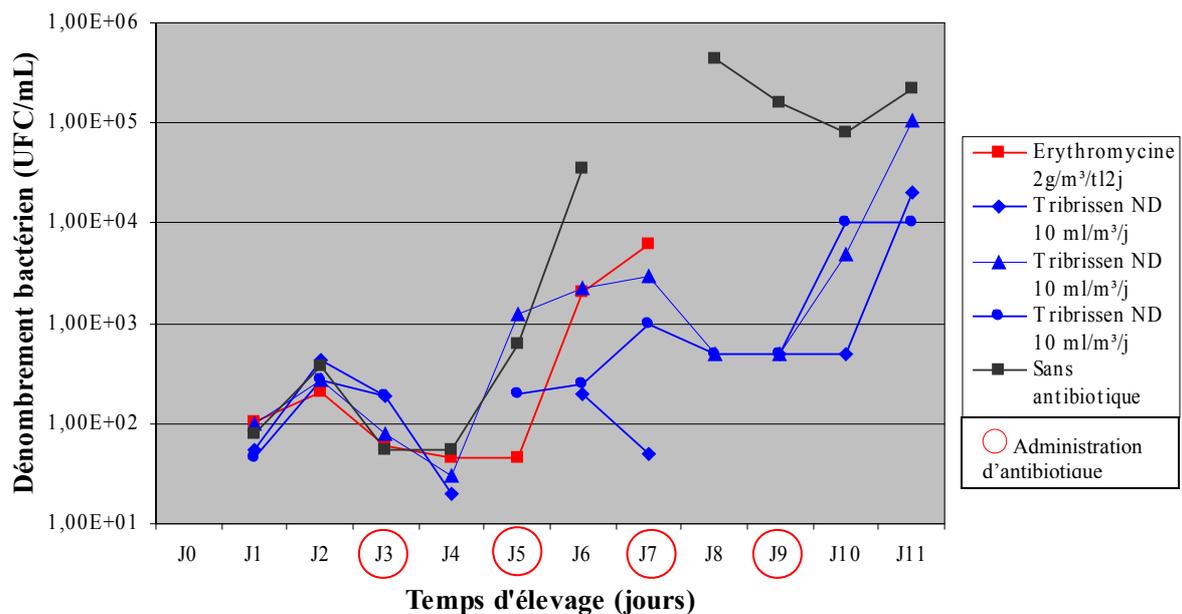
Graph 16 : suivi de la flore vibronacée dans les scobs 150 L

• Le troisième graphique présente les aptitudes assez comparables des différents protocoles à maîtriser le développement de la flore hétérotrophe totale dans les bacs de 2 m³. Avec la mortalité observée qui nous a incité à vider le bac « Érythromycine 2g/m³/t2j », il nous manque un élément de comparaison pour juger de la réelle efficacité du Tribissen ND. On peut noter à cette occasion qu'une mortalité anormale en bac larvaire ne s'accompagne pas nécessairement d'une flambée des populations bactériennes.



Graph 17 : suivi de la flore hétérotrophe totale dans les bacs de 2 m³

• Le quatrième graphique semble indiquer une bonne efficacité du Tribissen ND dans le contrôle de la flore Vibrionacée dans les bacs de 2m³, qu'il convient toujours de pondérer à cause de la perte de « Érythromycine 2g/m³/t2j ».

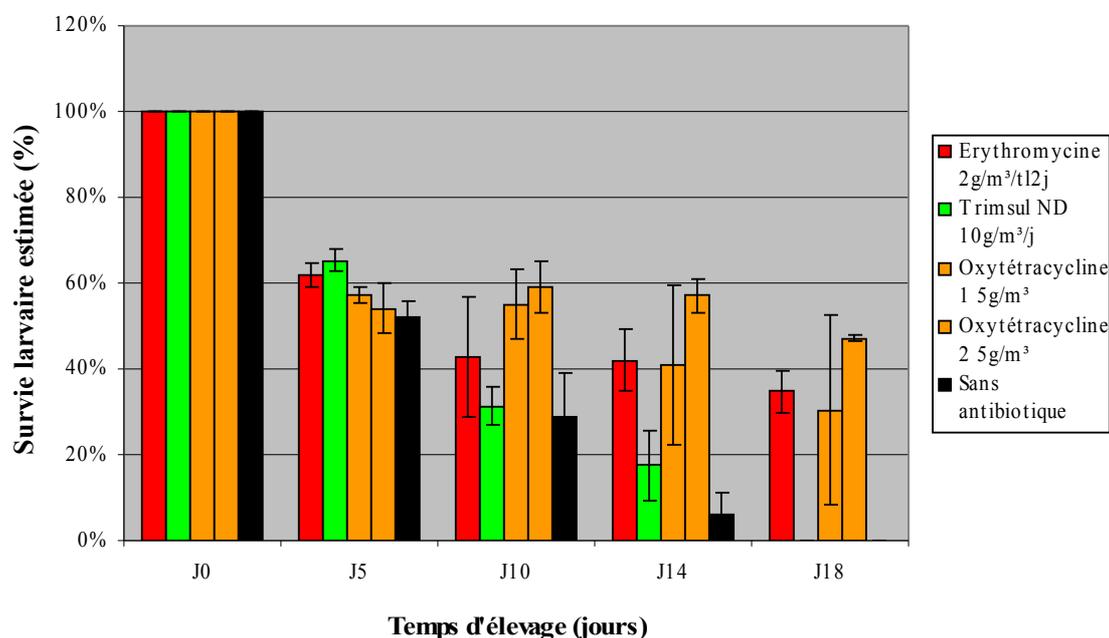


Graph 18 : suivi de la flore Vibrionacée dans les bacs de 2 m³

2.2 - Résultats et discussion de la production 0304 :

2.2.1 – Survie larvaire estimée

• Les différents scobs de 150 L présentent des survies larvaires comparables jusqu'à J5. La survie à J5 est dans l'ensemble faible, ce qui nous suggère une qualité moyenne des larves. À partir de J10, une baisse notable de la survie larvaire apparaît chez le témoin négatif « Sans antibiotique » et le protocole « Trimsul ND 10g/m³/j ». La mortalité observée dans le bac « Trimsul ND 10g/m³/j » nous contraint à le vider à J15. Les protocoles à base d'oxytétracycline affichent de bons résultats voire meilleurs que « Érythromycine 2g/m³/tl2j ». La survie larvaire estimée à J18 est comprise entre 40 et 48% pour cinq scobs sur six. En matière de survie larvaire, nous obtenons au cours de la production 0304 des résultats diamétralement opposés à ceux de la production 0303.

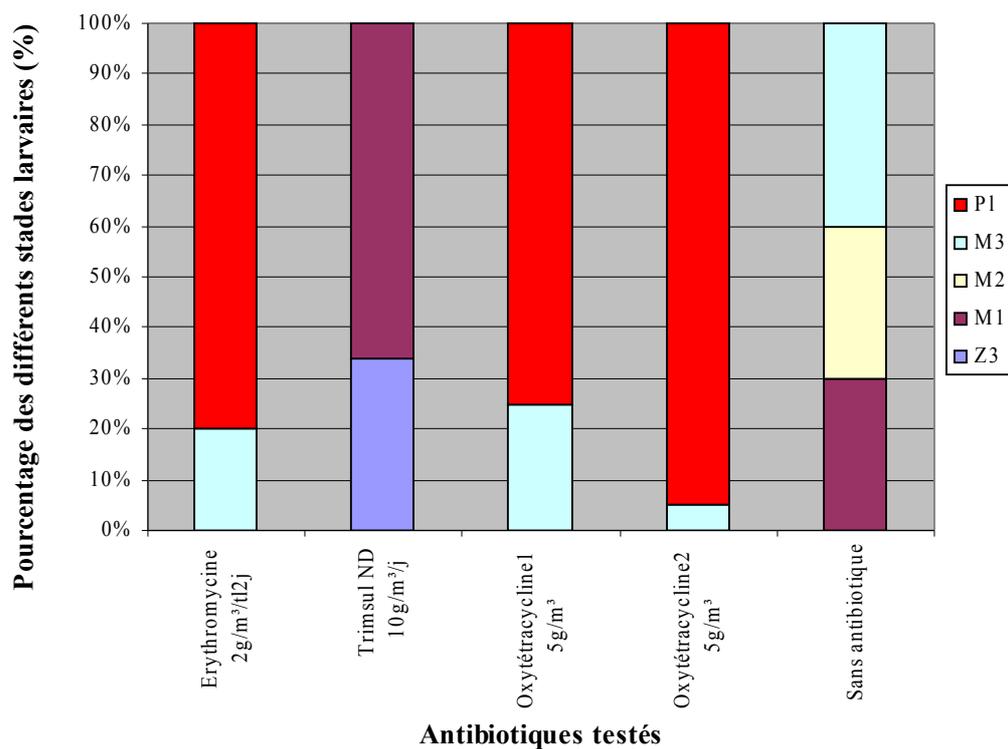


Graph 19 : survie larvaire estimée dans les scobs de 150 L à J5, J10, J14, J18 lors de la production 0304

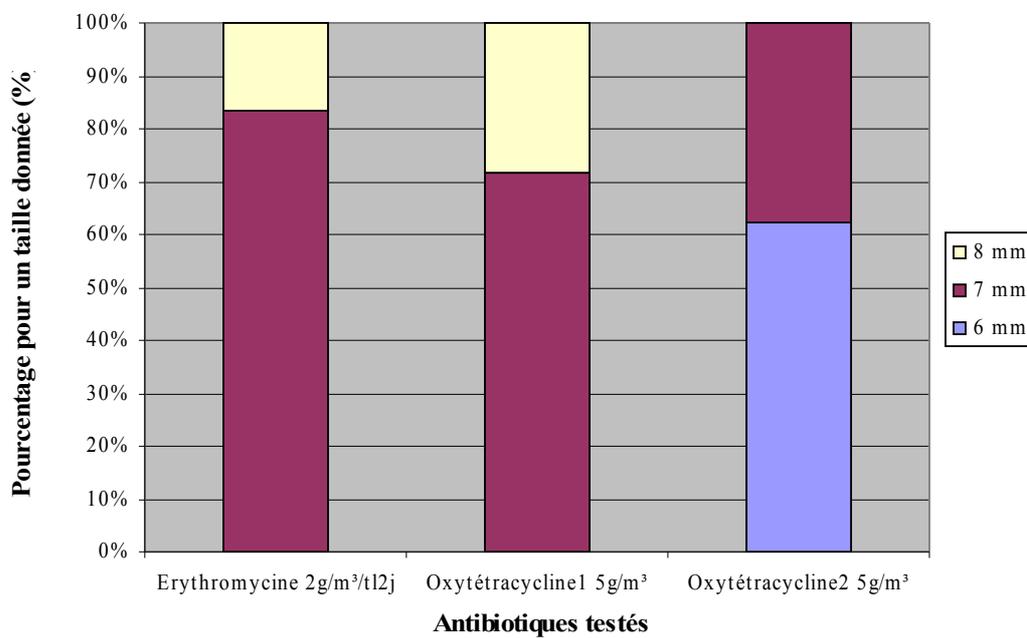
2.2.2 – Distribution des stades larvaires

• Notre attention s'est à nouveau portée sur la transition Mysis3-Postlarve. Les protocoles « Oxytétracycline1 5g/m³ », « Oxytétracycline2 5g/m³ » (voir matériel et méthodes) et « Érythromycine 2g/m³/tl2j » semblent les plus intéressants sur le plan du passage des stades larvaires. Par contre « Trimsul ND 1 10g/m³/j », renouvelle les retards de stades observés à la production 0303.

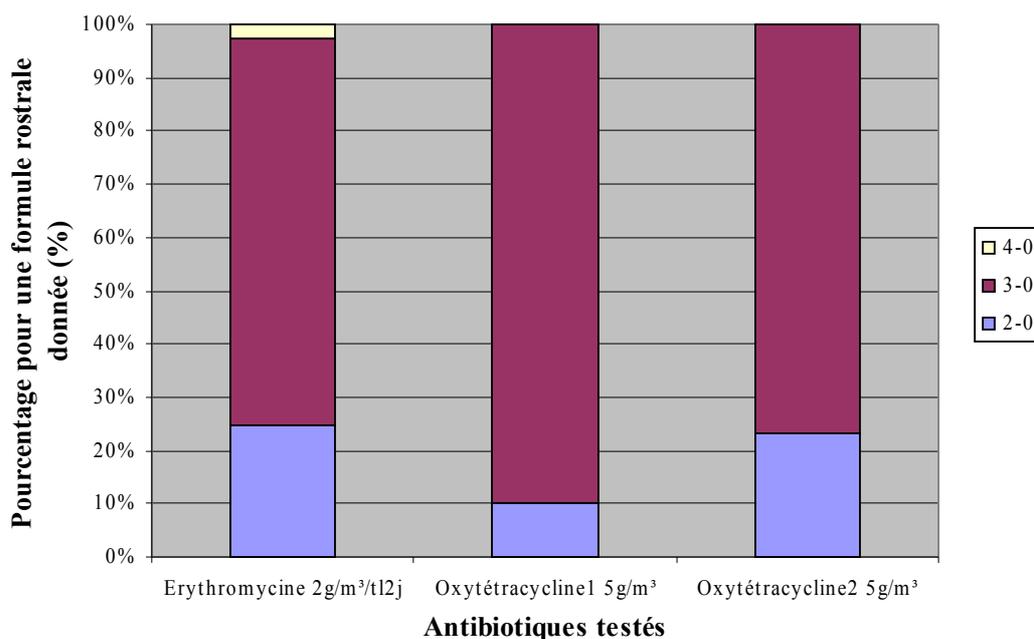
• À J21, les bacs ont été pêchés pour évaluer les tailles et les formules rostrales des larves P10. Les protocoles « Oxytétracycline1 5g/m³ » et « Oxytétracycline2 5g/m³ » donnent des résultats comparables à « Érythromycine 2g/m³/tl2j ».



Graph 20 : distribution des stades larvaires à J12 lors de la production 0304



Graph 21 : taille des larves P10 à J21 lors de la production 0304



Graph 22 : formule rostrale des larves P10 à J21 lors de la production 0304

2.3 - Résultats et discussion de la production 0305 :

- À partir de « Oxytétracycline1 » et de « Oxytétracycline2 » de la production 0304, nous avons constitué un dernier protocole « Oxytétracycline 5g/m³ » où la dernière administration a lieu à J13. Cette limitation survient car il est spécifié dans le cahier des charges Carrefour que le traitement (à base d'érythromycine) ne doit pas excéder quinze jours. Par ailleurs, la dose de 1,5 g/m³ à J11 est remplacée par 5 g/m³, ce qui nous semble plus en adéquation avec un changement d'eau de 100% qui est opéré à cette date.

- Il apparaît nécessaire d'adapter le protocole à base de Trimsul ND afin de tenter de s'affranchir du retard observé dans le passage des stades larvaires :

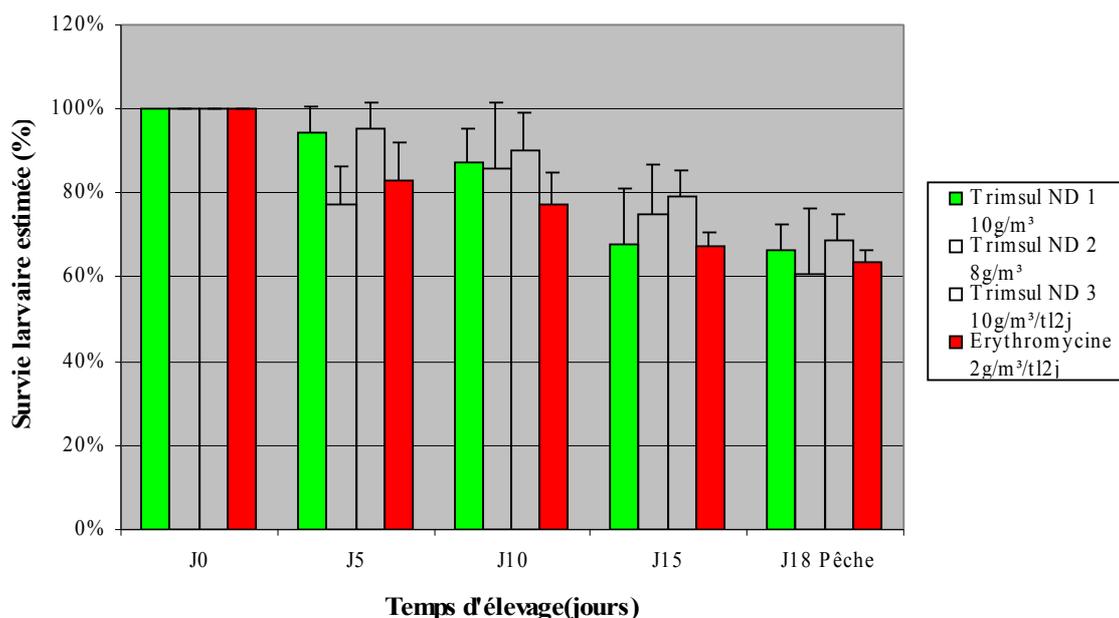
- La concentration C_{tmpsulfa} (4,8 g/m³ de principes actifs équivalent à 10 g/m³ de Trimsul ND) n'est pas remise en cause. D'après la partie « sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution », il s'agit de la concentration optimale pour les écloséries. Elle constituera donc la « dose d'attaque » qui sera employée à J3 après la mise à niveau à 100% de l'eau dans les bacs.

- Dans le graphique 24, on peut constater une bonne survie larvaire avec le Trimsul ND à 5g/m³/j. Le graphique 26 atteste aussi des bons résultats du Trimsul ND à 5 g/m³/j en matière de passage de stades. Cette posologie constituera donc la « dose intermédiaire » qui sera appliquée à J4, J5, J6, J7, J8. Elle sera ajustée à 7,5 g/m³ pour J9, dernier jour d'administration, après le changement d'eau de 75%.

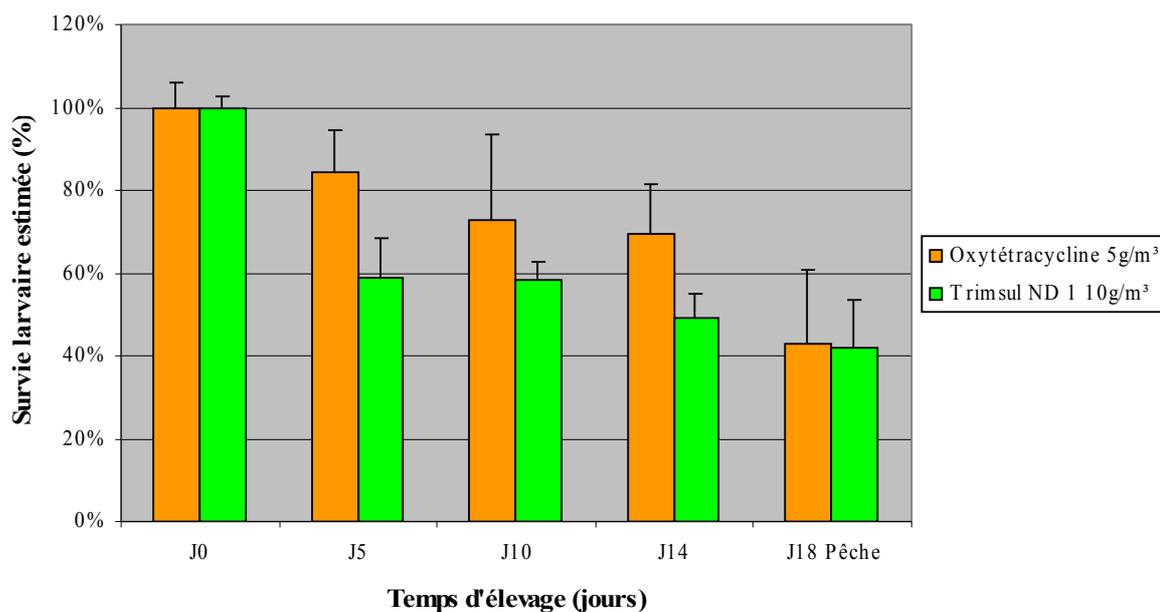
Nous venons de définir le protocole «Trimsul ND 1 10g/m³». Deux protocoles supplémentaires font également l'objet de tests : «Trimsul ND 2 8g/m³» avec une dose d'attaque légèrement inférieure à C_{tmpsulfa} , et «Trimsul ND 1 10g/m³/tl2j» avec un rythme d'administration différent.

2.3.1 – Survie larvaire estimée

- Les différents scobs de 150 L présentent de bonnes survies larvaires jusqu'à J18, sans différence notable entre les différents protocoles. Les modifications du protocole à base de Trimsul ND semblent appropriées. La survie larvaire observée lors de cette production apparaît globalement meilleure que celle de la seconde production. Peut-être est-ce dû au changement de saison ou à l'emploi de meilleurs géniteurs.



Graph 23 : survie larvaire estimée dans les scobs de 150 L à J5, J10, J14, J18 lors de la production 0305

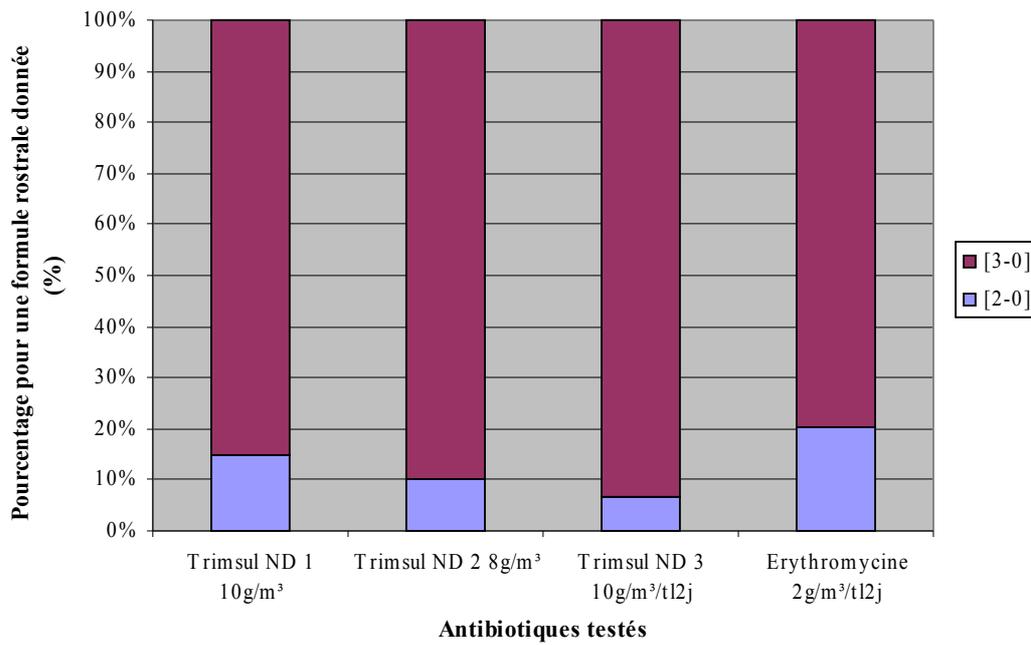


Graph 24 : survie larvaire estimée en bacs de 2-4 m³ à J5, J10, J15 lors de la production 0305

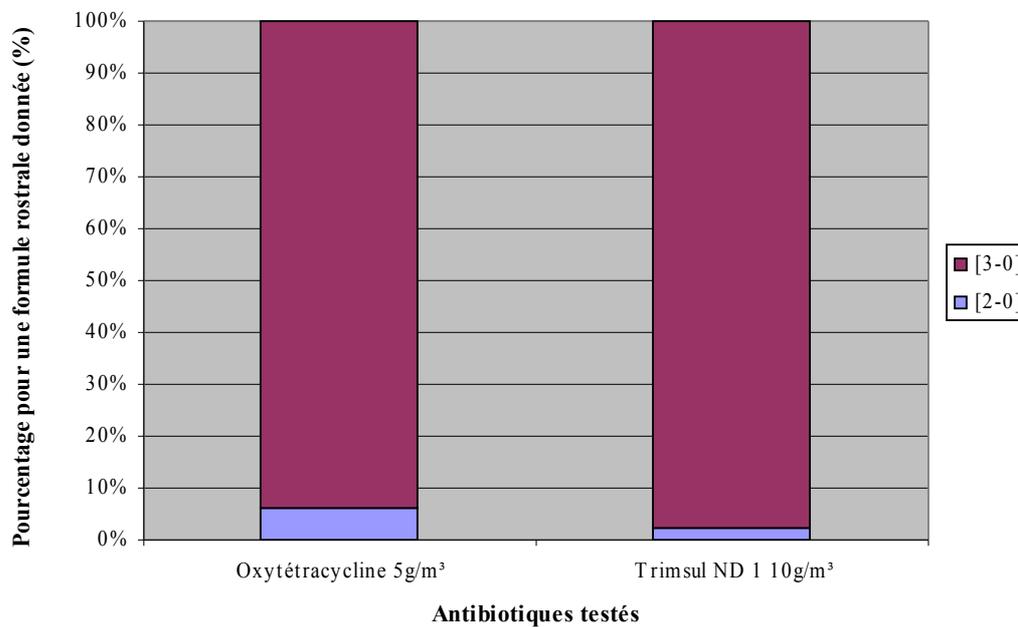
- L'essai en bacs de 2-4 m³ a pour objet de valider les tests en petits volumes des deux dernières productions. Au cours de cette production, le remplissage des bacs s'est faite de la manière suivante :
 - Les deux bacs « Oxytétracycline 5g/m³ » de 2 m³ le premier jour de récupération de pontes,
 - Les bacs « Trimsul ND 1 10g/m³ » et « Érythromycine 2g/m³/tl2j » de 2 m³ le surlendemain,
 - Puis le bac de 4 m³ « Oxytétracycline 5g/m³ »,
 - Enfin le bac de 3 m³ « Trimsul ND 1 10g/m³ ».
- Au final, la survie à J18 est équivalente pour les deux protocoles de substitution mais l'évolution des bacs n'a pas été la même :
 - On peut remarquer que la survie nauplii-zoé 3 se dégrade au cours de la production. En effet, les résultats des bacs « Trimsul ND 1 10g/m³ » à J5 sont de 20 % inférieurs à ceux des bacs « Oxytétracycline 5g/m³ ». À nouveau, le témoin positif « Érythromycine 2g/m³/tl2j » a été vidé, aucune larve n'étant observée à J4.
 - Les bacs « Oxytétracycline 5g/m³ » ont une survie proche de 70 % à J14 ; des difficultés dans l'approvisionnement en *Artemia* combinées avec les changements d'eau de 100 % expliquent la baisse importante de la survie après J14.
 - Par contre, les bacs « Trimsul ND 1 10g/m³ » n'ont pas subi ce phénomène, ces derniers ayant eu un changement d'eau classique et la perte a été moins importante dans ce cas.

2.3.2 – Distribution des stades larvaires

- À la transition Mysis3-Postlarve, tous les bacs affichent 100% de post-larves.
- Lors de la pêche à J18, les larves des scobs de 150 L mesurent de 7 à 7,2 mm (écart-types : 0,5 0,4 et 0,5 mm) pour les trois protocoles à base de Trimsul ND (écart-types : 0,5 0,4 et 0,5 mm), de 7,3 mm pour le protocole « Érythromycine 2g/m³/tl2j », (écart-type 0,4mm). À la même date, les larves des bacs de 2-4 m³ mesurent 7,8 mm pour le protocole « Oxytétracycline 5g/m³ » (écart-type 0,4 mm) et 8 mm pour le protocole « Trimsul ND 1 10g/m³ » (écart-type 0,3 mm).
L'examen des formules rostrales sur les larves montre des résultats comparables entre les trois protocoles à base de Trimsul ND et le protocole « Érythromycine 2g/m³/tl2j » dans les scobs de 150 L et des résultats comparables entre le protocole « Oxytétracycline 5g/m³ » et le protocole « Trimsul ND 1 10g/m³ » dans les bacs de 2-4 m³.



Graph 25 : formule rostrale des larves P10 dans les scobs de 150 L à J18 lors de la production 0305



Graph 26 : formule rostrale des larves P10 dans les bacs de 2-4 m³ à J18 lors de la production 0305

III – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- L'emploi d'une dose d'attaque suivie de doses intermédiaires dans les protocoles « Oxytétracycline 5g/m³ » et « Trimsul ND 1 10g/m³ » résout les retards de passage de stades, tout en garantissant de bonnes survies larvaires.

- Le retard de stade s'explique peut-être par le fait que l'antibiotique s'accumule dans le milieu d'élevage jusqu'au premier changement d'eau. Il serait intéressant d'effectuer un dosage des antibiotiques dans l'eau par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Cela permettrait de confirmer cette hypothèse d'accumulation et d'adapter plus finement les doses intermédiaires, en recherchant le maintien d'une concentration d'antibiotique égale à la concentration C jusqu'à J9.

En dosant les antibiotiques par HPLC sur un broyat de larves, il serait également possible de répondre à une question importante : les crevettes incorporent-elles l'antibiotique ou traite-t-on le milieu d'élevage uniquement ?

Conclusion générale

- Les essais « Differential plating » ont permis de découvrir la grande variabilité selon l'origine des prélèvements de la sensibilité des flores hétérotrophe totale et Vibrionacée au chlorhydrate d'oxytétracycline et à l'association triméthoprim - sulfadiazine. Une étude plus fine des populations bactériennes permettrait de proposer une explication aux différences observées entre les quatre écloséries. La mise en place d'un registre d'élevage où seraient stipulés tous les traitements effectués et leurs conséquences sur la production faciliterait aussi une telle étude. De nouveaux essais seraient nécessaires afin de déterminer plus finement les concentrations C_{otc} et $C_{impsulfa}$.

- Les essais d'innocuité ont été l'occasion d'apporter de nouvelles données sur la toxicité aiguë des antibiotiques sur les larves de crevettes. Jusqu'à présent, deux études seulement ont été publiées sur ce sujet, dont une seule avec la recherche des CL50. Les essais menés ont permis de mettre en avant la sécurité d'emploi du chlorhydrate d'oxytétracycline et de l'association triméthoprim - sulfadiazine avec une absence d'effets toxiques observés aux concentrations usuelles de traitement. De nouveaux essais avec la gamme de raison 1,56 permettraient d'obtenir des valeurs plus précises des $CL50_{24h}$ et ainsi de calculer les indices thérapeutiques correspondants.

- Les essais d'efficacité ont été menés avec des conditions d'élevage aussi proches que possibles de celles d'une éclosérie privée. Les résultats du témoin négatif « sans antibiotique » sont la confirmation, qu'en l'état actuel de nos connaissances, l'élevage larvaire ne peut être mené convenablement sans l'emploi d'antibiotique. De même, le témoin positif « Érythromycine 2g/m³/t12j » a présenté à deux reprises les mêmes défaillances que chez les éclosiers privés. Les protocoles « Oxytétracycline 5g/m³ » et « Trimsul ND 1 10g/m³ » sont l'aboutissement de ce stage de six mois. Ils semblent à même de remplacer le protocole actuel, en cas de développement d'antibiorésistances à l'érythromycine. On pourra reprocher l'usage d'oxytétracycline pure dans les trois productions de la partie « efficacité ». C'est en fait par défaut que la molécule pure a été utilisée. Nous ne disposons pas de spécialités au début du stage et nous ne voulions pas perdre le bénéfice de trois productions nécessaires à la mise au point des protocoles. Des essais avec les spécialités proposées dans la partie « présentation des antibiotiques de substitution » seraient la suite logique de ce travail.

Antibiotiques de substitution	Protocole	Changements d'eau
Oxytétracycline	5 g/m ³ à J3, J9, J11, J13 1,5 g/m ³ à J5, J7	Montagnès 100% à J9, J11, J13, J15, J17
Trimsul ND 1 triméthoprim – sulfadiazine	10g/m ³ à J3 5 g/m ³ à J4, J5, J6, J7, J8 7,5 g/m ³ à J9	Classique 50% à J9, J11, J14, J15, J16, J17, J18, J19 75% à J13

- Toutes les écloseries privées de Nouvelle - Calédonie emploient actuellement un système de chloration - déchloration pour traiter les effluents d'élevage larvaire. En considérant les structures et les propriétés physico - chimiques des antibiotiques choisis, un tel système semble approprié pour dégrader le chlorhydrate d'oxytétracycline ou l'association triméthoprim - sulfadiazine.

- Certains développements pourraient être menés afin de compléter ce travail :

Un dosage de l'antibiotique dans l'eau d'élevage par chromatographie liquide haute performance permettrait :

- de vérifier l'hypothèse d'accumulation de l'antibiotique (dosages quotidiens jusqu'à J9),
- d'affiner les doses intermédiaires des protocoles (dosages quotidiens jusqu'à J9),
- de déterminer la teneur en résidus d'antibiotique en fin d'élevage larvaire (dosage le jour de la pêche),
- de vérifier l'efficacité de la chloration-déchloration (dosages avant et après le traitement des rejets d'écloserie), ce qui constituerait une première démarche pour évaluer l'impact sur l'environnement.

Un dosage de l'antibiotique sur un broyat de larves par chromatographie liquide haute performance permettrait de savoir si l'on traite seulement le milieu d'élevage ou si la crevette incorpore également le médicament. La difficulté réside ici dans la mise au point des méthodes d'extraction, de purification des antibiotiques pour le dosage par HPLC.

- Il semblerait aussi intéressant d'approfondir certains aspects de la zootechnie :

Le suivi des paramètres du milieu gagnerait probablement à être rationalisé. Le paramètre température est bien contrôlé, mais il est aussi important d'effectuer des mesures précises du pH, de l'oxygène et des composés azotés. Cela permettrait de connaître ces paramètres lors d'une production performante et il serait plus aisé alors de reproduire ces conditions avec des valeurs de référence. De même, lors d'un épisode de mortalité, le relevé des paramètres serait précieux pour mieux définir le phénomène.

Concernant la gestion de l'eau d'élevage, des essais sur l'influence du niveau de filtration devraient être menés (eau filtrée sur 0,2 au lieu de 5 voire 50 μm). Pareillement, de nouveaux essais sur le rythme et la modalité des changements d'eau seraient intéressants pour juguler le développement exponentiel des flores bactériennes, le challenge étant ici d'éviter au maximum les excédents d'aliments.

- La recherche d'une alternative à l'usage d'antibiotiques peut être finalement la démarche la plus séduisante. Certains aquaculteurs emploient depuis longtemps les micro - algues *Tetraselmis* (isoT) et *Chaetoceros* avec succès dans la séquence alimentaire de leur élevage larvaire. En plus de l'aspect nutritionnel, ils pensent que ces micro - algues ont un effet régulateur des flores bactériennes. Ces micro - algues produisent-elles des molécules antibactériennes ? Hébergent-elles une flore associée qui produit des antibiotiques ou qui constitue des probiotiques ? Les probiotiques, justement, sont peut-être la solution « biologique » tant attendue.

Références bibliographiques

- [1] BARNES A.C. ; HASTINGS T.S. ; AMYES S.G.B. : Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18, 463-465.
- [2] CASTILLE F.L. ; LAWRENCE A.L. : The toxicity of erythromycin, minocycline, malachite green and formalin to nauplii of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1986, 17, 1-4.
- [3] DELÉPÉE R. : Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole. Thèse : Université de Nantes, école doctorale : chimie biologique, spécialité : chimie environnementale, 2003, 244p.
- [4] DENECE. E. : *Penaeus stylirostris* : la filière géniteur et l'élevage larvaire à la station aquacole de Saint-Vincent. Rapport de stage, IFREMER Station d'Aquaculture de Saint Vincent, Nouvelle-Calédonie, 1995-45p.
- [5] FAO et Multimedia Asia Co. : Diagnosis of shrimp diseases, with emphasis on the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. CD-ROM, 1999.
- [6] Groupement des Fermes Aquacoles de Nouvelle-Calédonie. Rapport d'activité 2002, 19p.
- [7] GRÄSLUND S. ; BENGTON B.E. : Chemicals and biological products used in south-east asian shrimp farming, and their potential impact on the environment – a review. *The Science of the Total Environment*, 2001, 280, 93-131.
- [8] GRÄSLUND S. ; HOLMSTRÖM K. ; WAHLSTROM A. : A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46, 81-90.
- [9] HALLING-SORENSEN : Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 2000, 40, 731-739.
- [10] LAPOUYADE P. : Recherches en zootechnie de crevettes et conditions favorisantes du syndrome 93, validation d'un nouvel antibiotique en élevage larvaire. Rapport de stage, IFREMER, Station d'Aquaculture de Saint Vincent, Nouvelle-Calédonie, 1995-61p.
- [11] LE GROUMELLE M. : Comparative study of bacterial infections responsible for mass mortality in penaeid shrimp hatcheries of the Pacific zone. In : SHARIFF M. ; ARTHUR J.R. ; SUBASINGHE R.P. (eds), *Diseases in Asian Aquaculture II*, Proceedings of the Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 25-29 october 1993, Phuket Thailand : Asian Fisheries Society, 1995, 163-173.
- [12] LEVY S.T. ; MAC MURRY L. ; BARBOSA T.M. ; BURDETT V. ; COURVALIN P., HILLEN W. ; ROBERTS M.V. ; ROOD J.I. ; TAYLOR D.E. : Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43 (6), 1523-1524.

[13] LIGHTNER D.V.(editeur et auteur) : A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp, 1^{ère} édition - Baton Rouge, Louisiana, USA : World Aquaculture Society, 1996-241p.

[14] LUNESTAD B.T ; SAMUELSEN O.B. ; FJELDE S. ; ERVIK A. : Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture*, 1995, 134 (3-4), 217-225.

[15] LUNESTAD B. T. ; SAMUELSEN O.B. : Effects of seawater on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture ; implications for MIC testing. *Aquaculture*, 2001, 196, 319-323.

[16] MARKING L.L. ; HOWE G.E. ; CROWTHER J.R. : Toxicity of erythromycine, oxytetracycline, and tetracycline administered to lake trout in water baths, by injection, or by feeding. *The Progressive Fish-Culturist*, 1988, 50, 197-201.

[17] MASSI F. :Antibiotiques et élevage larvaire de pénéides. Rapport de stage, IFREMER Station d'Aquaculture de Saint Vincent, Nouvelle-Calédonie, 1998-107p.

[18] MERLAUT G. : Rapport d'activité sur le test du Tribissen en élevage larvaire de crevettes pénéides. Rapport de stage, IFREMER Station d'Aquaculture de Saint Vincent, Nouvelle-Calédonie, 2001-24p.

[19] NEUMAN M. : Vade-mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux, 5^{ème} édition - Paris : MALOINE, 1990 - 812p.

[20] PARK E.D. ; LIGHTNER D.V. ; MILNER, N. ; MAYERSOHN M. ; PARK, D.L. ; GIFFORD J.M. ; BELL T.A. : Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1995, 130, 113-128.

[21] PRIMAVERA J.H. LAVILLA-PITOGO J.H. ; LADJA C.R. ; DE LA PENA J.M. : A survey of chemicals and biological products used in intensive prawn farms in Philippines. *Marine pollution Bulletin*, 1993, 26 (1), 35-40.

[22] REED L. A. : Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture*, 2003, sous presse.

[23] SEIGNE A. : Mise en place d'un système de traitement des effluents pour une éclosérie de crevettes Pénéides en Nouvelle-Calédonie, étude d'une méthode d'élimination d'un antibiotique et de stérilisation bactérienne dans un effluent. Rapport de stage DESTA, CNAM - Université de Montpellier II, 2001-54p.

[24] WILLIAMS R. R. ; BELL T.A. ; LIGHTNER D.V. : Shrimp antimicrobial testing II : toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1992, 4, 262-270.

[25] WOLLENBERGER L. ; HALLING-SORENSEN B. ; KUSK K.O. : Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2000, 40, 723-730.

Bibliographie complémentaire

ALDERMAN D.J. ; SMITH P.: Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 2001, 196, 211-243.

BATICADOS M.C.L. ; LAVILLA-PITOGO C.R. ; CRUZ-LACIERDA E.R DE LA-PENA L.D. ; SUNAZ N.A : Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases of aquatic organisms*, 1990, 9 (2), 133 - 139.

BELL T.A.: Overview of diseases and drug needs for major aquaculture species : shrimp. *Vet hum toxicol*, 1991, 33 supplément 1, 20-23.

BELL T.A.: Principals of shrimp culture chemotherapy. In : WYBAN J. (eds), *Proceedings of the special session on shrimp farming*, Baton Rouge, LA USA : World aquaculture society, 1992, 227-237.

BELL T.A. ; LIGHTNER D.V. : Chemotherapy in aquaculture today practices in shrimp culture : available treatments and their efficacy. In : MICHEL C. et ALDERMAN D.J. (eds), Paris : OIE éditions, 1992, 45-57.

BERTHE F.C.J. : Effets des antibiotiques à concentrations subinhibitrices chez les crevettes pénéides : une hypothèse sur leurs modes d'action en élevage larvaire. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 1994, 170 (2/3), 167-170.

BRANSON E. : Clinical relevance of minimum inhibitory concentrations (MIC's). *Aquaculture*, 2001, 196, 289-296.

BROWN J.H. : Antibiotics : their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture*, 1989, 20 (2), 34-49.

CHRISTOFILOGIANNIS P. : Current inoculation methods in MIC determination. *Aquaculture*, 2001, 196, 297-302.

D'AGOSTINO A. : Antibiotics in cultures of invertebrates. In : SMITH W.L. ; CHANLEY M.H. (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Plenum Press, New York, 1972, 109-133.

DALSGAARD I. : Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 2001, 196, 267-275.

FEGAN D.F. : Recent developments and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. In : WYBAN J. (ed.), Baton Rouge, LA USA : World Aquaculture Society, *Proceedings of the special session on shrimp farming*, 1992, 55-69.

FLEGEL T.W : Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In : Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, Honolulu, Hawaii : Proceedings of a workshop, 1992, 57-112.

FURONES M.D. : Sampling for antimicrobial sensitivity testing : a practical consideration. Aquaculture, 2001, 196, 303-309.

HOLMSTRÖM K ; GRÄSLUND S. ; WAHLSTRÖM A. ; POUNGSHOMPOO S. ; BENGTSOON B.E. ; KAUTSKY N. : Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts on human health. International Journal of Food Science and Technology, 2003, 38, 255-266.

LIAO I.C. : Diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan : a review from 1977 to 1991. In : Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, Proceedings of a workshop in Honolulu, Hawaii, 1992, 113-137.

MOHNEY L.L. ; BELL T.A. ; LIGHTNER D.V. : Shrimp antimicrobial testing I : in vitro susceptibility of thirteen gram negative bacteria to twelve antimicrobials. Journal of Aquatic Animal Health, 1992, 4, 257-261.

MOLINA-AJA A ; GARCIA-GASCA A. ; ABREU-GROBOIS A. ; BOLAN-MEJIA C. ; ROQUE A. ; GOMEZ-GIL B. : Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. FEMS microbiology letters, 2002, 213, 7-13.

PINAULT L. : Vade-mecum de législation en pharmacie vétérinaire, 3ème édition – Maisons-Alfort : Éditions du Point Vétérinaire, 2003-384p.

POULIQUEN H. ; LE BRIS H. ; PINAULT L. : Experimental study on the decontamination kinetics of seawater polluted by oxytetracycline contained in effluents released from a fish farm located in a salt-marsh. Aquaculture, 1993, 112, 113-123.

ROQUE A. MOLINA-AJA A. ; BOLAN-MEJIA C. ; GOMEZ-GIL B. : In vitro susceptibility to 15 antibiotics of *Vibrios* isolated from Penaeid shrimps in Northwestern Mexico. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 17, 383-387.

SAHUL-HAMEED A.S. RAHAMAN K.H. ; ALAGAN A. ; YOGANANDHAN K. : Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 2003, 217, 39-48.

SCHNICK R.A. : International harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs. Aquaculture, 2001, 196, 277-288.

VANDAËLE : Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de santé animale, 12^{ème} édition – Maisons-Alfort : Éditions du Point Vétérinaire, 2003-1760p.

VANDENBERGHE J. ; VERDONCK L. : *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. Applied and Environmental Microbiology, June 1999, 65 (6), 2592-2597.

ANNEXE 1 : La Filière crevetticole de Nouvelle-Calédonie

FICHE SYNTHETIQUE **PREGENITEUR**

Enceinte	D
Surface	1200 m²

Essai	G346
Période	20-déc-01 18-avr-02
Durée	119 Jours

Renouvellement	15 %/jour	minimum	maximum
		Salinité	
		Température	24 °C 35 °C

ENSEMENCEMENT		Date	Nbre	Age	Pds moyen	Biomasse
Origine	SASV B	20-déc-01				0,00 kg
		N3	400	P22		0,00 kg
		N2	1100	P24		0,00 kg
						0,00 kg
		Total	1500			0,00 kg

Densité	1,25 ind/m²
----------------	-------------------------------

Charge	0,00 g/m²
---------------	-----------------------------

PECHE	Date	Nbre	Age	Pds moyen	Biomasse
	16-avr-02	508		29,90 g	15,19 kg
	18-avr-02	655	119 Jours	30,00 g	0,00 kg 19,65 kg 0,00 kg
	Total	1163			34,84 kg

Densité	0,97 ind/m²
----------------	-------------------------------

Charge	29,03 g/m²
---------------	------------------------------

Survie	77,53 %
---------------	----------------

Rendement extrapolé	0,89 t/ha/an
----------------------------	---------------------

Aliment	nature	Sica
	quantité(kg)	65,10 kg
	conversion	1,87

Destination	Elevage G355 Bassin J
--------------------	----------------------------------

FICHE JOURNALIERE GENITEURS (MATURATION)

Date	
------	--

Scob	Nombre	Sexe	T°C		Aliment		Mues	Mortes	Maturations	Fécondations	Observations
			8h	17h	8h	17h					
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											

PRODUCTION									
ESPECE :					MANIP. EVENTUELLE				
ELEVAGE LARVAIRE N° :									
	Date	Bac	Stade	Nb	T°C	Chgt H ₂ O	Traitement	Nourriture	Observations
J0									
J1									
J2									
J3									
J4									
J5									
J6									
J7									
J8									
J9									
J10									

JOUR	STADE	NOMBRE	CHANGEMENT D'EAU	T°C	TRAITEMENT	NOURRITURE	OBSERVATIONS
J0	Nii	150-200 / Litre		29 °C	TREFLAN 40 ml/m ³		
J1	Nii Z1			29 °C		20 h 1 g/m ³ RC	Comptage binoculaire. Augmentation du bullage à 14h
J2	Z1	survie de 80 à 100 %		29 °C		6h 10h 15h 20h 1 g/m ³ RC 5-50	Comptage binoculaire. Augmentation du bullage à 7h30
J3	Z1 Z2			29 °C	Erythro. g/m ³ 2	6h 10h 15h 20h 1 g/m ³ RC 5-50	Comptage au litre
J4	Z2			29 °C		6h 10h 15h 20h 1 g/m ³ RC 5-50	Lancer 40g d'artémia /m ³ d'élevage larvaire
J5	Z3			29 °C	Erythro. g/m ³ 2	6h,20 h 0,5 g/m ³ GP50-100 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Augmentation du bullage à 7h30 Lancer 50g d'artémia /m ³ d' E.L.
J6	M1			29 °C		6h,20 h 0,5 g/m ³ GP50-100 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 50g d'artémia /m ³ d' E.L.
J7	M2			29 °C	Erythro. g/m ³ 2	6h,20 h 0,5 g/m ³ GP50-100 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 60g d'artémia /m ³ d' E.L.
J8	M3			29 °C		6h,20 h 0,5 g/m ³ GP50-100 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 65g d'artémia /m ³ d' E.L.
J9	P1	survie de 80 à 90 %	Changement partiel 50%	29 °C	Erythro. 2 g/m ³ Tréflan 100 ml/m ³	6h,20 h 0,5 g/m ³ GP100- 200 6h, 10, 15h, 20h artémia	Lancer 65g d'artémia /m ³ d' E.L.
J10	P2			29 °C		6h,20 h 0,5 g/m ³ GP100- 200 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 65g d'artémia /m ³ d' E.L.
J11	P3		Changement partiel 50%	29 °C	Tréflan 100 ml/m ³	6h,20 h 0,5 g/m ³ GP100- 200 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 70 g d'artémia / m ³ d' E.L.
J12	P4			29 °C		6h,20 h 1 g/m ³ GP200- 300 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 70 g d'artémia / m ³ d' E.L.
J13	P5		Changement partiel 70%	29 °C	Tréflan 100 ml/m ³	6h,10h,20 h 1 g/m ³ GP200-300 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 75 g d'artémia / m ³ d' E.L.
J14	P6		Changement partiel 50%	29 °C	Tréflan 100 ml/m ³	6h,10h,20 h 2 g/m ³ GP200-300 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 75 g d'artémia / m ³ d' E.L.
J15	P7		Changement partiel 50%	29 °C	Tréflan 100 ml/m ³	6h,10h,20 h 2 g/m ³ GP200- 300 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 80 g d'artémia/ m ³ d' E.L.
J16	P8		Changement partiel 50%	29 °C	Tréflan 100 ml/m ³	6h,10h,20 h 2 g/m ³ GP300-500 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Arrêt des résistances Lancer 80 g d'artémia/ m ³ d' E.L.
J17	P9		Changement partiel 50% eau froide		Tréflan 100 ml/m ³	6h,10h,20 h 2 g/m ³ GP300-500 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 80 g d'artémia/ m ³ d' E.L.
J18	P10		Changement partiel 50% eau froide		Tréflan 100 ml/m ³	6h,10h,20 h 2 g/m ³ GP300-500 6h, 10h, 15h, 20h artémia	Lancer 80 g d'artémia/ m ³ d' E.L.

PRODUCTION

ESPECE :						ORIGINE	
NURSERIE N° :							
	Date	Stade	Nb	T°C	Chgt H ₂ O	Nourriture	Observations
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					
J		P					

ANNEXE 2 : Présentation des antibiotiques

Antibiotiques employés en éclosion de crevettes dans le monde :

Antibiotiques	Protocole d'antibioprévention	Commentaires	Références bibliographiques
Chloramphénicol	utilisé auparavant comme traitement lors d'épisodes de mortalité aiguë	INTERDIT dans toutes les productions animales (aplasie médullaire chez l'homme)	[7] [18]
Nifurpirinol (Famille des Nitrofuranes)	?	INTERDIT	[7]
Furazolidone (Famille des Nitrofuranes)	0,2g/m ³ à J3, J5, J7, J9	INTERDIT	[7] Essais IFREMER
Erythromycine (Famille des Macrolides)	2g/m ³ à J3, J5, J7, J9	Employé actuellement en Nouvelle - Calédonie	[7] [18] Essais IFREMER
Tétracycline (Famille des Tétracyclines)	?		[8]
Chlortétracycline (Famille des Tétracyclines)	?		[8]
Oxytétracycline (Famille des Tétracyclines)	Objectif de ce stage	Essais à venir au LAC IFREMER	[7] [18] Essais IFREMER
Gentamicine (Famille des aminosides)	?		[8]
Sulfaméthazine (Famille des Sulfamides)	?		[8]
Triméthoprime (Famille des Diaminopyrimidines)	?		[8]
Association Orméthoprime-Sulfaméthoxazole	?		[7]
Association Triméthoprime-Sulfadiazine	Objectif de ce stage?	Essais à venir au LAC IFREMER	[7]
A. oxolinique (Famille des Quinolones, 1 ^{ère} génération)	0,1-1g/m ³ à J3, J5, J7, J9 en petits volumes	Expérimental seulement Essais effectués au LAC IFREMER avec l'Inoxyl ND Toxicité larvaire (excipient)	[7] [8] Essais IFREMER

Antibiotiques	Protocole d'antibioprévention	Commentaires	Références bibliographiques
A. nalidixique (Famille des Quinolones, 1 ^{ère} génération)			[7]
Fluméquine (Famille des Quinolones, 2 ^{ème} génération)			[7]
Enrofloxacin (Famille des Quinolones, 3 ^{ème} génération)			[7]
Enrofloxacin (Famille des Quinolones, 3 ^{ème} génération)			[7] [8]
Sarafloxacin (Famille des Quinolones, 3 ^{ème} génération)			[7]
Norfloxacin (Famille des Quinolones, 3 ^{ème} génération)		Médicament réservé à l'usage en médecine humaine	[7] [8]
Perfloxacin (Famille des Quinolones, 3 ^{ème} génération)		Médicament réservé à l'usage en médecine humaine	[8]
Ciprofloxacin (Famille des Quinolones, 3 ^{ème} génération)		Médicament réservé à l'usage en médecine humaine	[8]
Tiamuline (Famille des Pleuromutilines)			[8]
Rifampicine (Famille des Rifamycines)		Médicament réservé à l'usage en médecine humaine, anti-tuberculeux.	[7]

ANNEXE 3 : Sensibilité des bactéries aux antibiotiques de substitution

Matériel nécessaire par écloserie :

- Deux étuves, la première réglée à la température de 20°C pour le séchage des boîtes avant étalement, la seconde à la température de 28°C pour la mise en culture après étalement,
- Trois fioles stériles étalonnées de 50 mL pour la préparation des solutions mères d'antibiotiques,
- Neuf fioles stériles étalonnées de 25 mL pour la préparation des solutions filles d'antibiotiques,
- Un tube à essai stérile de 20 mL et une pipette stérile de 20 mL pour le prélèvement d'eau d'écloserie,
- Deux micropipettes,
- Trois tubes à dilution remplis de 4,5 mL d'eau de mer stérile pour les dilutions d'eau d'écloserie,
- Un agitateur vortex pour homogénéiser le prélèvement et les différentes dilutions,
- Une bouteille de gaz et un bec de gaz dans le cas où les étalements sont effectués sur le terrain (écloserie du Nord),

Consommables :

- Antibiotiques purs,
- 132 boîtes de Petri,
- Gélose MH+2,5%NaCl préparée à l'avance en tubes pré-autoclavés,
- Gélose TCBS,
- Cônes stériles pour les micropipettes,
- Pipettes Pasteur stériles pour les étalements.

ANNEXE 4 : Innocuité et détermination des CL50

Matériel nécessaire :

- Deux tamis, l'un de maille de 100 μm , l'autre de maille de 235 μm ,
- Deux pissettes, l'une remplie d'eau de mer filtrée sur 0,2 μm , additionnée d'EDTA à 5 mg/L, l'autre remplie de formol 10%,
- Dix bouteilles tests et deux bouteilles témoins de 1 L,
- Un ballon de transfert de 2 L stérile,
- Bullages individuels pour chaque bouteille et pour le ballon de transfert,
- Un stéréomicroscope,
- Une cellule de comptage,
- Un pH-mètre,
- Un oxymètre.

Consommables :

- Antibiotiques,
- Eau de mer filtrée à 0.2 μm ,
- EDTA 5 g/m³,
- Microparticules Bernaqua® Royal Caviar 5-50, Golden Pearls 50-100 et 100-200,
- Larves (12*150 Zoé et 12*150 Mysis),
- Éclairage (Néons).

PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS D'INNOCUITÉ

Suivi des paramètres de milieu lors du premier essai sur les larves Zoé2 :

Substances d'essai	pH					Température (°C)					O2 (% saturation)				
	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h
Oxytétracycline 10000C _{otc}	1,57	1,44				28,7	30,3				non mesuré	non mesuré			
Oxytétracycline 1000C _{otc}	2,43	2,27				28,7	30,1				non mesuré	non mesuré			
Oxytétracycline 100C _{otc}	7,55	8,02	7,91	7,91		28,5	29,8	30	30		97,00%	97,10%	96,40%	96,40%	
Oxytétracycline 10C _{otc}	8,05	8,3	8,28	8,26	8,23	28,4	29,7	29,8	29,9	30,8	96,20%	96,70%	96,20%	96,10%	96,40%
Oxytétracycline 1C _{otc}	8,03	8,35	8,31	8,26	8,21	28,4	29,6	29,7	29,9	30,8	95,80%	96,00%	95,60%	96,70%	96,70%
Trimsul ND 10000C _{tmpsulfa}	9,5	9,56				28	29,2				92,30%	non mesuré			
Trimsul ND 1000C _{tmpsulfa}	8,31	8,51				28,3	29,5				95,00%	96,00%			
Trimsul ND 100C _{tmpsulfa}	8,3	8,48	8,5			28,2	29,7	29,9			96,40%	96,80%	96,40%		
Trimsul ND 10C _{tmpsulfa}	8,05	8,22	8,21	8,27	8,23	28,2	29,8	29,9	30	30,9	95,30%	97,00%	96,30%	96,70%	97,00%
Trimsul ND 1C _{tmpsulfa}	8,01	8,18	8,17	8,24	8,21	28,1	29,8	29,9	30	30,8	95,20%	97,90%	96,40%	96,00%	96,00%
Erythromycine 1C _{erythro}	8,02	8,22	8,16	8,21	8,17	28	29,7	29,8	29,9	30,8	95,10%	97,20%	96,30%	96,10%	96,10%
Sans antibiotique	8,01	8,22	8,22	8,27	8,26	28,2	29,6	29,7	29,8	30,7	96,00%	98,20%	96,50%	97,80%	99,00%

Suivi des paramètres de milieu lors du premier essai sur les larves Mysis1 :

Substances d'essai	pH					Température (°C)					O2 (% saturation)				
	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h
Oxytétracycline 1296C _{otc}	2,1	2,15				29,7	29,6				non mesuré	mesuré			
Oxytétracycline 216C _{otc}	4,4	4,59				29,5	29,2				non mesuré	mesuré			
Oxytétracycline 36C _{otc}	7,96	8,23	8,31	8,33	8,33	29,2	29	29	28,5	28,7	97,20%	96,50%	98,70%	97,80%	98,70%
Oxytétracycline 6C _{otc}	8,19	8,37	8,42	8,42	8,41	29,2	28,9	28,8	28,4	28,5	97,70%	97,30%	97,70%	98,60%	97,80%
Oxytétracycline 1C _{otc}	8,3	8,41	8,48	8,47	8,44	29,1	28,8	28,5	28	28,2	97,50%	97,10%	97,80%	97,70%	97,80%
Trimsul ND 1296C _{tmpsulfa}	8,31	8,86				29	28,8				96,10%	97,10%			
Trimsul ND 216C _{tmpsulfa}	8,26	8,65	8,78	8,80		29,1	28,8	28,6	28,3		97,20%	97,00%	97,70%	98,70%	
Trimsul ND 36C _{tmpsulfa}	8,35	8,40	8,56	8,55	8,53	29,3	29	28,8	28,3	28,4	97,40%	97,10%	96,00%	97,80%	97,80%
Trimsul ND 6C _{tmpsulfa}	8,32	8,34	8,44	8,47	8,44	29,3	29	28,7	28,2	28,4	97,50%	97,30%	98,70%	96,00%	97,70%
Trimsul ND 1C _{tmpsulfa}	8,28	8,34	8,45	8,45	8,40	29,2	29	28,8	28,3	28,5	96,50%	98,00%	98,60%	97,80%	96,50%
Erythromycine 1C _{erythro}	8,27	8,29	8,40	8,40	8,34	29,2	29,1	29	28,4	28,5	97,50%	97,00%	97,80%	97,80%	96,00%
Sans antibiotique	8,29	8,32	8,41	8,43	8,39	29,2	28,9	28,9	28,2	28,5	97,10%	98,40%	97,80%	97,80%	97,30%

DEUXIEME SERIE D'ESSAIS D'INNOCUITE

Suivi des paramètres de milieu lors du second essai sur les larves Zoé2 :

Substances d'essai	pH					Température (°C)					O2 (% saturation)				
	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h
Oxytétracycline 1296C _{otc}	2,09	2,19				30,8	28,8				non	mesuré			
Oxytétracycline 216C _{otc}	4,62	4,75				30,5	28,7				non	mesuré			
Oxytétracycline 36C _{otc}	7,75	8,32	8,25	8,26	8,19	30,5	28,7	28,4	28,2	28,7	97,10%	97,20%	97,10%	97,50%	97,10%
Oxytétracycline 6C _{otc}	8,18	8,46	8,4	8,41	8,29	30,5	28,7	28,4	28	28,6	96,70%	97,70%	96,70%	97,10%	96,30%
Oxytétracycline 1C _{otc}	8,3	8,48	8,41	8,45	8,34	30,4	28,6	28,4	28	28,5	96,00%	97,50%	96,00%	96,70%	97,80%
Trimsul ND 1296C _{tmpsulfa}	8,31	8,73				30,6	28,7				92,30%	97,10%			
Trimsul ND 216C _{tmpsulfa}	8,26	8,56				30,5	28,7				97,00%	97,00%			
Trimsul ND 36C _{tmpsulfa}	8,29	8,5	8,49	8,57		30,4	28,8	28,7	28,2		97,10%	97,10%	96,00%	97,30%	
Trimsul ND 6C _{tmpsulfa}	8,23	8,4	8,37	8,4	8,26	30,3	28,6	28,4	28	28,5	97,30%	97,30%	98,70%	98,00%	97,10%
Trimsul ND 1C _{tmpsulfa}	8,23	8,4	8,37	8,4	8,27	30,3	28,6	28,4	28	28,4	97,10%	98,00%	98,60%	97,10%	96,70%
Erythromycine 1C _{érythro}	8,23	8,39	8,36	8,42	8,29	30,2	28,5	28,3	28	28,4	96,30%	96,30%	97,80%	96,30%	97,10%
Sans antibiotique	8,24	8,34	8,34	8,39	8,27	30,3	28,5	28,3	28	28,4	96,50%	96,50%	97,80%	97,80%	96,70%

Suivi des paramètres de milieu lors du second essai sur les larves Mysis1 :

Substances d'essai	pH					Température (°C)					O2 (% saturation)				
	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h	To	24h	48h	72h	96h
Oxytétracycline 1296C _{otc}	2,25	2,2				29,4	28,7				non	mesuré			
Oxytétracycline 216C _{otc}	4,82	4,88				29,6	28,5				non	mesuré			
Oxytétracycline 36C _{otc}	8	8,23	8,05	8,1	8,09	29,5	28,4	29,2	28,5	28,1	97,20%	97,20%	97,80%	97,20%	96,00%
Oxytétracycline 6C _{otc}	8,26	8,35	8,25	8,22	8,17	29,5	28,4	29	28,4	28	97,70%	97,70%	98,60%	97,70%	96,80%
Oxytétracycline 1C _{otc}	8,38	8,41	8,32	8,28	8,24	29,3	28,3	29,1	28,4	28	97,50%	97,50%	97,70%	98,60%	97,00%
Trimsul ND 1296C _{tmpsulfa}	8,37	8,84				29,3	28,4				97,10%	96,10%			
Trimsul ND 216C _{tmpsulfa}	8,37	8,59	8,51			29,5	28,5	29,2			97,00%	97,20%	96,00%		
Trimsul ND 36C _{tmpsulfa}	8,4	8,42	8,31	8,34	8,31	29,5	28,6	29,4	28,6	28,2	97,10%	97,40%	97,70%	97,70%	98,70%
Trimsul ND 6C _{tmpsulfa}	8,35	8,33	8,18	8,21	8,12	29,3	28,4	29,4	28,4	28	97,30%	97,50%	98,70%	98,70%	97,10%
Trimsul ND 1C _{tmpsulfa}	8,31	8,34	8,21	8,24	8,15	29,3	28,3	29,3	28,3	28	98,00%	96,50%	98,60%	97,10%	97,10%
Erythromycine 1C _{érythro}	8,3	8,32	8,22	8,22	8,16	29,2	28,3	29,2	28,3	28	96,30%	97,50%	97,10%	96,30%	97,70%
Sans antibiotique	8,28	8,25	8,18	8,16	8,11	29,3	28,4	29,1	28,3	28	96,50%	97,10%	96,30%	97,80%	97,70%

TROISIEME SERIE D'ESSAIS D'INNOCUITE

Suivi des paramètres de milieu lors du troisième essai sur les larves Zoé2 :

Substances d'essai	pH		Température (°C)		O2 (% saturation)	
	To	24h	To	24h	To	24h
Oxytétracycline 213,21C _{otc}	4,67	4,69	29,1	28,4	non	mesuré
Oxytétracycline 136,67C _{otc}	6,02	6,15	29	28,1	97,20%	97,10%
Oxytétracycline 87,61C _{otc}	7,7	7,98	29	28	97,70%	96,70%
Oxytétracycline 56,2C _{otc}	8,06	8,23	28,8	28,1	97,50%	96%
Oxytétracycline 36C _{otc}	8,16	8,29	28,8	28,1	95,80%	97,50%
Trimsul ND 213,21C _{tmpsulfa}	8,3	8,51	29	28,1	92,30%	96,10%
Trimsul ND 136,67C _{tmpsulfa}	8,31	8,56	29	28,1	95,00%	97,20%
Trimsul ND 87,61C _{tmpsulfa}	8,3	8,42	28,9	28,3	96,40%	97%
Trimsul ND 56,2C _{tmpsulfa}	8,34	8,48	28,6	28,1	97,30%	97,10%
Trimsul ND 36C _{tmpsulfa}	8,32	8,45	28,6	28	98,00%	96,40%
Erythromycine 1C _{érythro}	8,32	8,38	28,6	28	96,30%	96,30%
Sans antibiotique	8,31	8,37	28,7	28	96,50%	96,50%

Suivi des paramètres de milieu lors du troisième essai sur les larves Mysis1 :

Substances d'essai	pH		Température (°C)		O2 (% saturation)	
	To	24h	To	24h	To	24h
Oxytétracycline 213,21C _{otc}	4,67	5,07	28,6	28,3	non	mesuré
Oxytétracycline 136,67C _{otc}	6,08	6,2	28,6	28,1	96,40%	97,70%
Oxytétracycline 87,61C _{otc}	7,8	8,02	28,5	28,1	96,10%	97,50%
Oxytétracycline 56,2C _{otc}	8,04	8,24	28,4	28	96,70%	96,10%
Oxytétracycline 36C _{otc}	8,23	8,31	28,3	28	97,50%	97,20%
Trimsul ND 213,21C _{tmpsulfa}	8,35	8,58	28,3	28	96,30%	96,50%
Trimsul ND 136,67C _{tmpsulfa}	8,37	8,58	28,3	28,1	97%	96,70%
Trimsul ND 87,61C _{tmpsulfa}	8,35	8,5	28,3	28,3	96,10%	96%
Trimsul ND 56,2C _{tmpsulfa}	8,37	8,42	28,1	28,1	97,20%	97,50%
Trimsul ND 36C _{tmpsulfa}	8,38	8,42	28	28	96,50%	96,10%
Erythromycine 1C _{érythro}	8,31	8,32	28,3	28	97,50%	97,50%
Sans antibiotique	8,33	8,34	28,2	28	97,10%	96,50%

ANNEXE 5 : Efficacité

• Interventions à l'écloserie :

Matériel écloserie :

- 32 scobs de 150 L,
- 5 bacs de 2 m³,
- Thermorégulateurs individuels,
- Résistances chauffantes,
- Système de bullage.

Consommables :

- Larves nauplii de crevettes,
- EDTA 5 g/m³,
- TreflanND Trifluraline 40 mL/m³,
- Larves nauplii d'*Artemia salina*,
- Microparticules Bernaqua® Royal Caviar 5-50, Golden Pearls 50-100 et 100-200,
- Antibiotiques.

• Interventions au laboratoire de pathologie (production 0303) :

- Des dilutions d'eau d'écloserie sont préparées. À cette fin, 500 µl d'échantillon d'eau des tubes à prélèvement de 20 mL sont prélevés à l'aide d'une micropipette puis dilués dans des tubes remplis de 4,5 mL d'eau stérile désionisée. L'opération est renouvelée jusqu'à obtention des dilutions souhaitées.
- 100 µl de ces dilutions sont prélevées à l'aide d'une micropipette puis étalés en duplicata à l'aide d'une pipette Pasteur sur des géloses Zobell pour la flore hétérotrophe totale et TCBS pour la flore vibrionacée. Les boîtes de Petri sont placées à l'étuve à 28°C et le comptage des colonies est effectué à 24 heures pour les géloses TCBS et cinq jours après étalement pour les géloses Zobell.

Matériel laboratoire :

- Une étuve réglée à la température de 28°C,
- Tubes stériles de 20 mL pour les prélèvements d'eau d'écloserie,
- Tubes stériles de 5 mL remplis de 4,5 mL d'eau stérile désionisée,
- Pipettes Pasteur ou râteaux stériles,
- Micropipettes.

Consommables :

- Cônes stériles pour micropipette,
- Boîtes de Petri,
- Milieux de culture Zobell et TCBS.

Protocole de suivi de la flore hétérotrophe totale et de la flore Vibrionacée :

J-1

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

J0

Prélever de l'eau d'un bac avant ensemencement des nauplii et étaler 100µL pur sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-1} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

J1

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL pur sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-2} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Compter les TCBS de J0 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

J2

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL pur sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-2} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Compter les TCBS de J1 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

J3

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL pur sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-2} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Commencer les traitements des bacs d'élevage larvaire.

Compter les TCBS de J2 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

J4

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL pur sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-2} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.

Compter les TCBS de J3 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

J5

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL pur sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-2} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.

Compter les TCBS de J4 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

Compter les Zobell de J0 en différenciant les types de colonies.

J6

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10^{-1} sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-3} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.

Compter les TCBS de J5 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

Compter les Zobell de J1 en différenciant les types de colonies.

J7

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10^{-2} sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-3} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.

Compter les TCBS de J6 en différenciant les colonies jaunes/vertes.

Compter les Zobell de J2 en différenciant les types de colonies.

J8

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10^{-2} sur 2 TCBS et 100µL à 10^{-3} sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.

Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.

Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.

Compter les TCBS de J7 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J3 en différenciant les types de colonies.

J9

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10⁻² sur 2 TCBS et 100µL à 10⁻³ sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.
Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.
Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.
Compter les TCBS de J8 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J4 en différenciant les types de colonies.

J10

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10⁻³ sur 2 TCBS et 100µL à 10⁻⁴ sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.
Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.
Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.
Compter les TCBS de J9 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J5 en différenciant les types de colonies.

J11

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10⁻³ sur 2 TCBS et 100µL à 10⁻⁴ sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.
Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.
Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.
Compter les TCBS de J10 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J6 en différenciant les types de colonies

J12

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10⁻³ sur 2 TCBS et 100µL à 10⁻⁴ sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.
Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.
Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.
Compter les TCBS de J11 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J7 en différenciant les types de colonies

J13

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10⁻³ sur 2 TCBS et 100µL à 10⁻⁴ sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.
Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.
Poursuivre les traitements des bacs d'élevage larvaire.
Compter les TCBS de J12 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J8 en différenciant les types de colonies

J14

Prélever de l'eau d'un bac de chaque traitement et étaler 100µL à 10⁻³ sur 2 TCBS et 100µL à 10⁻⁴ sur 2 Zobell pour chaque prélèvement et mettre à l'étuve à 28°C.
Mettre à l'étuve 2 boîtes de Zobell et 2 boîtes de TCBS par prélèvement pour séchage.
Compter les TCBS de J13 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J9 en différenciant les types de colonies.

J15

Compter les TCBS de J14 en différenciant les colonies jaunes/vertes.
Compter les Zobell de J10 en différenciant les types de colonies.

J16

Compter les Zobell de J11 en différenciant les types de colonies.

J17

Compter les Zobell de J12 en différenciant les types de colonies.

J18

Compter les Zobell de J13 en différenciant les types de colonies.

J19

Compter les Zobell de J14 en différenciant les types de colonies.

L'ÉLEVAGE LARVAIRE DE CREVETTES EN NOUVELLE - CALÉDONIE

L'Oxytétracycline et l'association Triméthoprimé – Sulfadiazine en tant qu'alternatives à l'emploi de l'Érythromycine en éclosion

RÉSUMÉ

L'aquaculture de la crevette Pénéide occupe une position majeure au sein des productions animales. La Nouvelle-Calédonie y participe activement grâce au développement de l'élevage de la crevette bleue du Pacifique *Litopenaeus stylirostris*. En l'état actuel de nos connaissances, l'élevage larvaire de crevettes ne peut être mené sans l'utilisation d'antibiotique. Les expériences menées au Laboratoire Aquacole Calédonien (LAC IFREMER Saint-Vincent) ont conduit à la mise au point de deux plans d'antibioprévention de substitution à l'érythromycine, l'un employant l'oxytétracycline (chlorhydrate), l'autre utilisant l'association triméthoprimé - sulfadiazine. Après une étude de la sensibilité des flores bactériennes hétérotrophe totale et Vibrionacée aux antibiotiques et une étude d'innocuité sur les larves de crevettes, les essais d'efficacité constituent la validation biologique des projets de protocoles.

SUMMARY

Aquaculture of penaeid shrimps holds a major place in productions of animals. New Caledonia takes part to these productions by developing the breeding of Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Nowadays, penaeid larviculture can't be undertaken unless antibiotics are used. Experiments in the Caledonian Aquacultural Laboratory (LAC IFREMER Saint-Vincent) put across to the development of two antibiotic prophylaxis plans for substitution of erythromycine, one plan with oxytetracycline (hydrochloride), the other plan with trimethoprim-sulfadiazine association. After an antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria and an acute toxicity study, efficacy assays are the biological validation of these projects of protocols.

MOTS CLÉS

Crevette, Éclosion, Oxytétracycline, Triméthoprimé, Sulfadiazine.

JURY

Président : Pascale JOLLIET, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes.

Rapporteur : Hervé LE BRIS, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes.

Assesseur : Hervé POULIQUEN, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes.

ADRESSE DE L'AUTEUR

9 Rue Jules Vallès
70400 Héricourt.