

IFREMER - Délégation de Nouvelle-Calédonie
BP 2059 – 98846 Nouméa cedex – Nouvelle-Calédonie

Emmanuel Goyard, Cyrille Goarant, Evelyne Bachère,
Julien de Lorgeril, Chantal Mugnier, Dominique Ansquer,
Francis Broutoi, Pierre Brun, Frédéric Imbert,
Carole Justou, Jean-René Maillez, Jacques Patrois,
Dominique Pham, Jean-Marie Peignon

novembre 2003 - DRV/RST/RA/LAC/2003-14

**Amélioration génétique expérimentale
de la crevette d'élevage
de Nouvelle-Calédonie :**

**Sélection d'une population de *L. stylirostris*
résistante à la bactérie pathogène
Vibrio penaeicida.**

Rapport final pour le Ministère de l'Outre-Mer

Résumé :

La filière crevette de Nouvelle-Calédonie repose sur la maîtrise de la reproduction contrôlée de la crevette *Litopenaeus stylirostris*, espèce introduite dans les années 80. La difficulté majeure que rencontre la filière depuis une dizaine d'années est la récurrence du « syndrome 93 », qui correspond à des épisodes de mortalités lors des baisses de température en avril-mai-juin. Ces mortalités sont associées à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida* et s'expriment à des niveaux d'intensité variable d'une année à l'autre et d'un bassin à l'autre. Aucune résistance vis-à-vis de cette pathologie ne s'est développée spontanément. Ceci est vraisemblablement lié au protocole employé pour l'élevage des géniteurs qui ne permet pas d'exercer une pression de sélection efficace à chaque génération.

Une expérience de sélection sur un critère de survie à des épisodes de syndrome 93 a été menée au Laboratoire Aquacole de Calédonie. La 3^{ème} génération sélectionnée montre des survies améliorées de l'ordre de 20% lors d'infections expérimentales à *V. penaeicida* par rapport à une population témoin non sélectionnée de même origine génétique. La comparaison des réponses corrélées sur le niveau d'expression de 5 gènes potentiellement impliqués dans les phénomènes de défense immunitaire (penaeidine, lysozyme, transglutaminase, profiline, annexine) montre que la population sélectionnée a un niveau d'expression en lysozyme deux fois plus élevé que la population témoin. Ce résultat suggère que le lysozyme pourrait être un marqueur génétique utilisable dans un programme de sélection à développer en relation avec les éclosiers de production.

Abstract :

The New-Caledonian shrimp industry is based on the controlled reproduction of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*, a species which was introduced in the 80s. The major difficulty to which the industry has been faced for 10 years is the occurrence of the "syndrome 93", which corresponds to mortality phases when the temperature falls down in April-May-June. This mortality is associated to the pathogenic bacteria *Vibrio penaeicida* and is expressed at different levels which are variable from year to year and from pond to pond. No resistance to this pathology has been developed spontaneously. This is likely due to the protocole used to rear spawners, which does not allow to implement an efficient selective pressure at each generation.

An experimental selection on the criteria of survival after picks of syndrome 93 has been conducted at the Laboratoire Aquacole de Calédonie. The 3rd selected generation demonstrates survival rates improved by 20% during experimental infections with *V. penaeicida* in comparison with a non selected control population of same genetic origin. The comparison of the correlated responses on the level of expression of 5 genes which are potentially implicated in immunity phenomena (Peneidins, lysozyme, transglutaminase, profilin, annexin) shows that the selected population has a level of expression in lysozyme twice higher than the control population. This result suggests that the lysozyme could be a genetic marker which could be used in a selective breeding program to be developed in relation with the private hatcheries.

Mots-clés :

Amélioration génétique, *P. stylirostris*, résistance, syndrome 93, Lysozyme

Keywords :

genetic improvement, *P. stylirostris*, résistance, syndrome 93, Lysozyme

Commentaire :

Sommaire

CONTEXTE	2
Contexte technico-économique	2
Contexte Scientifique	4
METHODES EMPLOYEES	7
Principe général	7
Méthode de gestion zootechnique et de sélection des géniteurs	7
Méthode d'évaluation de la réponse en termes de résistance	11
Méthode d'évaluation de la réponse corrélée au niveau des effecteurs immunitaires	12
Matériel biologique et extraction d'ARN totaux	12
Analyse de l'expression par Northern Blot	13
RESULTATS-DISCUSSION	15
Résultats des infections expérimentales par balnéation sur les G2	15
Résultats sur les G3	16
Survie aux infections expérimentales par injection	16
Survie en bassins de production	17
Immunologie comparée des populations témoin et sélectionnée	17
CONCLUSION	20
ANNEXE	21
Adaptation du protocole d'infection expérimentale de <i>Litopenaeus stylirostris</i> avec <i>Vibrio penaeicida</i> en Nouvelle-Calédonie : facteurs limitants pour une utilisation en sélection génétique.	21
BIBLIOGRAPHIE	23

Amélioration Génétique expérimentale de la crevette d'élevage de Nouvelle-Calédonie :

Sélection d'une population de *L. stylirostris* résistante
au pathogène *Vibrio penaeicida*.

Contexte

Contexte technico-économique

La production de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie repose exclusivement sur l'élevage de *Litopenaeus stylirostris* à partir des pontes de géniteurs d'élevage (**Figure 1**). Cette espèce, originaire d'Amérique Centrale et du Sud, a été progressivement domestiquée depuis une vingtaine de générations grâce à une dynamique particulière liée :

- aux recherches amont menées par l'IFREMER au Centre Océanologique du Pacifique à Tahiti (Aquacop, 1979);
- aux recherches plus appliquées menées par l'IFREMER à la Station d'Aquaculture de Saint-Vincent en Nouvelle Calédonie ;
- au développement d'écloseries de production de post-larves et de fermes de grossissement (respectivement 3 et 10 en activité en 2000) (**Figure 2**).

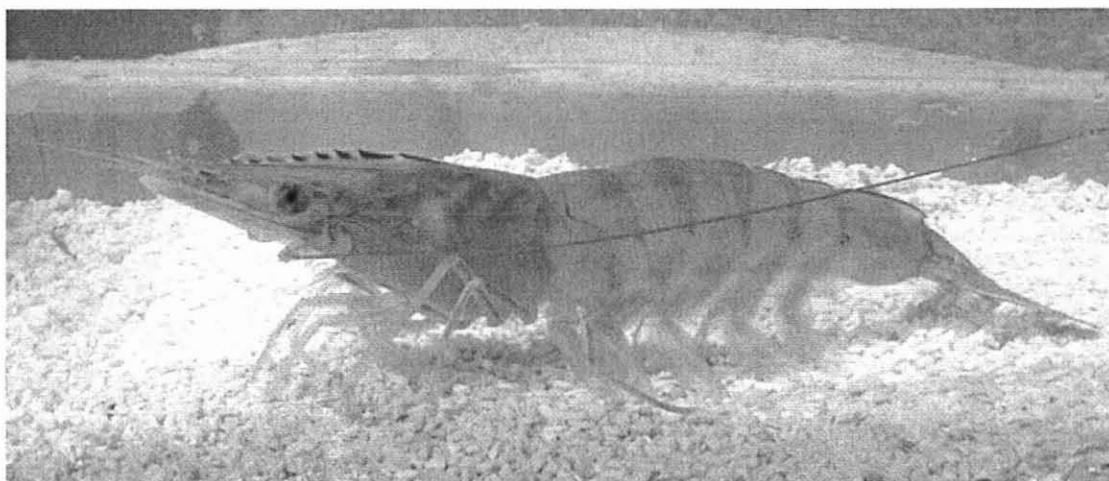


Figure 1 : Spécimen de *L. stylirostris*

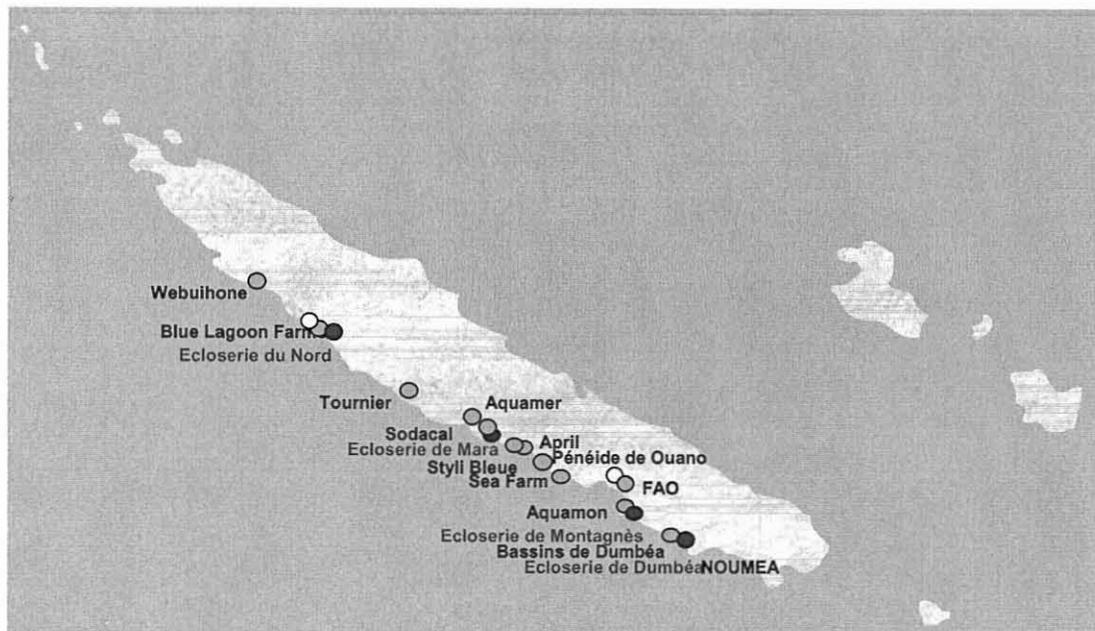


Figure 2 : implantation des fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie

Cette domestication dont *L. stylirostris* a bénéficié, et qui peut être définie comme la sélection qui s'opère spontanément pour de meilleures aptitudes à l'élevage, est susceptible d'expliquer, au moins partiellement, les excellentes performances enregistrées sur les fermes de Nouvelle-Calédonie, avec des rendements de l'ordre de 4 tonnes/ha/an (Lucien-Brun, 2001), et la résistance de la souche au virus IHNV présent en Calédonie (Weppe *et al.*, 1992). La filière représente la seconde activité agricole du pays (et sa première exportation agricole) et a un impact social significatif, principalement en milieu rural, avec près de 900 emplois induits. Les perspectives de développement de la filière sont importantes puisque les objectifs de croissance fixés par les responsables politiques territoriaux et des 2 provinces productrices correspondent à un passage de 2000t/an à 5000t/an en 10 ans.

D'un point de vue biologique, la difficulté majeure que rencontre la filière est l'existence, depuis 1993, d'épisodes de mortalités lors des baisses de température en avril-mai-juin avec des niveaux d'intensité variable d'une année à l'autre et d'un bassin à l'autre (Mermoud *et al.*, 1998 ; **Figure 3**). En première approche, on peut considérer que les bassins touchés par cette pathologie baptisée « syndrome 93 » enregistrent une survie deux fois plus faible que des bassins non touchés (20-25% de survie au lieu de 50-60%). Cette pathologie touche toutes les tailles d'animaux, mais on note qu'elle n'affecte pratiquement pas les bassins à très faible densité d'élevage, comme ceux, de petite surface, que les écloseries privées consacrent à la production de géniteurs de qualité pour la reproduction de l'espèce et la production de post-larves destinées aux bassins de grossissement.

A l'échelle des exploitations, cette pathologie pose de gros problèmes non seulement par les pertes de récolte qu'elle entraîne mais aussi par son aspect aléatoire (qui rend difficiles la gestion zootechnique des bassins et la gestion financière des entreprises).



Figure 3 : Crevette moribonde

A l'échelle de la filière, les conséquences sont lourdes non seulement en pertes mais aussi en termes de difficulté d'organisation, car les producteurs cherchent à éviter les élevages de saison fraîche, provoquant un engorgement saisonnier de l'atelier de conditionnement (SOPAC) et concentrant ainsi sur de courtes périodes les besoins en post-larves pour l'ensemencement des bassins de grossissement.

Contexte Scientifique

Les protocoles de production de géniteurs mis en œuvre par les écloséries de Calédonie consistent à élever, depuis le stade post-larve, des animaux à faible densité (1-2 individus/m²) afin de favoriser leur croissance et leurs performances reproductives. Comme le syndrome 93 n'affecte pratiquement pas les bassins d'élevage à faible densité, cette pratique ne s'accompagne pas, ou pratiquement pas, d'une pression de sélection spontanée pour la résistance à cette maladie. En outre, le fait que l'intervalle de génération soit de l'ordre de 8 à 12 mois induit que certaines générations peuvent ne pas être exposées aux périodes à risques, ce qui limite encore plus dans le temps l'effet d'une très faible pression de sélection. En d'autres termes, à supposer que la population calédonienne dispose d'une variabilité génétique pour le caractère de résistance à cette pathologie, celui-ci n'a pas pu être sélectionné spontanément avec la zootechnie pratiquée.

La faisabilité de la sélection sur la vitesse de croissance ou sur la résistance à certains pathogènes a été démontrée chez différentes espèces de crevettes pénéides (Hetzl *et al.*, 1999 ; Wyban et Swingle, 1999 ; Argue *et al.*, 2000). Chez *L. stylirostris*, la base génétique de la résistance au virus IHHN de la population tahitienne a été signalée par Weppe (1992), bien que cette résistance ne soit pas le fruit d'un programme de sélection orienté, mais le produit de la domestication de cette espèce en présence du virus. Les travaux de sélection expérimentale menés à Tahiti sur une population génétiquement proche de celle de Calédonie (Goyard *et al.*, sous presse) ont montré que des gains de productivité peuvent être attendus de la mise en œuvre de méthodes relativement simples

de sélection des géniteurs sur un critère de croissance (Bédier *et al.*, 1996), (Goyard *et al.*, 2001). Une expérience préliminaire de sélection individuelle en milieu d'élevage pour la résistance au syndrome 93 a été menée en 1996 au LAC (données non publiées) : en une génération, le gain de survie enregistré avait été de 7 points (38% pour la population sélectionnée contre 31% pour la population témoin) correspondant à une augmentation de la production de l'ordre de 22%. Ces résultats encourageants n'avaient pas été confirmés, par manque de moyens humains et techniques.

Les mortalités observées lors des épisodes de syndrome 93 sont associées au développement de la bactérie *Vibrio penaeicida* dans les élevages. Les souches de *V. penaeicida* isolées ont une très forte pathogénicité et sont capables de reproduire par infection expérimentale de *L. stylirostris* saines l'ensemble du tableau anatomo-pathologique du Syndrome 93 (Aquacop, données non publiées). Afin de disposer d'un outil permettant l'étude de la maladie à *V. penaeicida*, l'IFREMER a développé au Laboratoire d'Aquaculture Tropicale (LAT) de Tahiti un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves (*i.e.* n'ayant jamais été en contact avec ce pathogène). Ce modèle utilise une voie d'infection respectant l'intégrité de l'animal puisqu'il repose sur une baignade des crevettes dans une suspension bactérienne. Les survies après infection dépendent des concentrations en pathogène utilisées lors des infections et la standardisation des conditions expérimentales a permis d'obtenir une dose létale pour 50% des crevettes infectées (DL50) reproductible (Saulnier *et al.*, 2000). Cet outil est désormais bien maîtrisé au LAT. Son application au Laboratoire d'Aquaculture de Calédonie (LAC) a donc été entreprise, en respectant les conditions expérimentales standardisées développées au LAT, et également en remplaçant la technique de baignade par une injection individuelle de pathogène afin de contrôler individuellement la dose infectante. Le LAC dispose maintenant d'un outil de comparaison de la résistance de différents lots de crevettes à la bactérie *V. penaeicida*. En revanche, dans l'état actuel des connaissances, il n'a pas été possible de standardiser les conditions d'infection sur des crevettes de petite taille élevées en Calédonie (2 à 3 grammes de poids moyen) de façon à obtenir une dose létale à 80%-90% standardisée (cf. **Annexe**). La difficulté majeure rencontrée est la grande variabilité de l'état physiologique des animaux en Calédonie en fonction des conditions environnementales d'élevage avant leur entrée en salle d'infection : la simple manipulation des animaux calédoniens, fréquemment porteurs de *V. penaeicida* (Goarant *et al.*, 2003), peut provoquer un stress déclenchant des mortalités de type Syndrome 93. Autrement dit, il n'est pas, ou pas encore, possible d'exercer une pression de sélection standardisée à chaque génération par infection expérimentale dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique, mais il est possible d'évaluer en conditions expérimentales la résistance à *V. penaeicida* de populations différentes élevées dans un environnement commun.

Parallèlement, plusieurs équipes ont montré l'existence d'effecteurs immunitaires chez les invertébrés, et en particulier celle de l'URM 5098 (DRIM) chez les crevettes pénéides. L'approche génomique réalisée a consisté à rechercher des effecteurs immunitaires différentiellement exprimés par *L. stylirostris* au cours d'une infection à *V. penaeicida*, et s'est concentrée sur la recherche des gènes dont l'expression est modulée dans les hémocytes, cellules immunocompétentes décrites chez les crustacés (Johansson, 2000). Cette étude a nécessité que les infections expérimentales soient réalisées sur des crevettes totalement indemnes de *V. penaeicida*, et a donc été réalisée au Centre Ifremer de Tahiti (site indemne de vibriose). Une banque soustractive d'ADN complémentaire (ADNc) d'hémocytes de crevettes a été réalisée suivant la méthode décrite par Diatchenko *et*

al.(1996), la soustraction étant réalisée entre des crevettes saines et des crevettes infectées, survivantes à l'infection. Ces travaux ont permis le séquençage d'une première série de 270 clones potentiellement modulés durant l'infection. Ce travail de séquençage a fourni un éventail de séquences de gènes déposées dans une base de données accessible sur l'intranet de l'IFREMER (w3.ifremer.fr/GenomicsBD/). Elles peuvent être classées dans différentes catégories fonctionnelles impliquées dans de nombreux phénomènes de défense immunitaire :

- Des effecteurs antimicrobiens, comme la **penaeidine-3** qui est un peptide antimicrobien caractérisé chez *L. vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997) et le **lysozyme** qui est une enzyme possédant des activités antimicrobiennes (Yu *et al.*, 2002).
- Des gènes impliqués dans la coagulation, comme la **transglutaminase** dont le rôle est connu dans la coagulation chez les arthropodes (Iwanaga et Kawabata, 1998).
- Des gènes impliqués dans le remodelage cellulaire, comme la **profiline** décrite chez l'oursin dans des mouvements cellulaires liés à la phagocytose (Smith *et al.*, 1995) et l'**annexine** décrite dans des phénomènes de remodelage tissulaire chez les vertébrés (Kang *et al.*, 1999).

Cependant, la relation entre niveau d'expression de ces gènes et le niveau de résistance n'a pas encore été démontrée. Ces effecteurs pourraient représenter des marqueurs génétiques de résistance particulièrement intéressants pour développer à plus long terme une Sélection Assistée par Marqueurs autrement dit une sélection sur un critère facilement mesurable de façon non destructive et corrélé au caractère économique d'intérêt qui constitue l'objectif de sélection, en l'occurrence la survie lors des épisodes de syndrome 93.

Ces éléments plaident en faveur d'une sélection expérimentale pour la résistance au syndrome 93 pour tenter d'apporter une solution au problème rencontré par la filière. Cependant, la faible variabilité génétique du stock calédonien, longtemps suspectée puis démontrée (Goyard *et al.*, sous presse) est un facteur limitant les probabilités d'obtenir une réponse à toute nouvelle pression de sélection, et justifiant un protocole aussi léger que possible pour répondre à la question d'une éventuelle base génétique de la résistance au syndrome 93.

Dans ce contexte, il a été décidé de mener une expérience de sélection sur un critère de survie dans les bassins d'élevage et de rechercher si la réponse à la sélection s'accompagnait d'une réponse sur différents effecteurs immunitaires susceptibles de devenir des critères de sélection utilisables dans le cadre d'un programme de sélection assisté par marqueur.

Méthodes employées

Principe général

L'expérience a consisté à utiliser comme reproducteurs d'une part des animaux ayant survécu à des épisodes de mortalité de type syndrome 93 dans des bassins de production, et d'autre part, des animaux issus des bassins d'élevage traditionnels de géniteurs à faible densité. Trois générations « sélectionnées » ont ainsi été produites, tandis que trois générations « témoins non sélectionnées » ont été produites simultanément à partir de la même base génétique. Cette stratégie de sélection a conduit à allonger l'intervalle de générations à 12 mois.

Les 2 populations ont été caractérisées à la seconde et à la troisième génération pour les caractères de survie aux infections expérimentales à *V. penaeicida* et pour le niveau d'expression des effecteurs immunitaires que sont les pénéidines, la transglutaminase, le lysozyme et l'annexine.

Méthode de gestion zootechnique et de sélection des géniteurs

Sélection des géniteurs G0 (année 2000)

Initialement, il était prévu d'utiliser :

- des géniteurs G0 ayant survécu à des épisodes de syndrome 93 pour produire la G1 sélectionnée ;
- leurs frères et sœurs élevés dans d'autres lots n'ayant pas subi le syndrome 93 pour produire la G1 témoin.

Dans ce but, une veille a été mise en place sur l'ensemble des lots issus des productions commerciales et expérimentales de début 2000.

Entre-temps, des mesures prophylactiques pour limiter les risques liés aux transferts de géniteurs en Nouvelle-Calédonie ont rendu impossible l'exploitation des survivants des lots commerciaux : seuls les lots élevés au LAC étaient susceptibles de fournir des géniteurs pour cette expérimentation. Parmi les lots en élevage au LAC, 2 lots issus des bacs 5, 6 et 8 de l'élevage larvaire 2000-01 ont été identifiés en juin pour fournir les géniteurs nécessaires à l'expérience. Le mode de constitution de ces lots et leurs performances en grossissement apparaissent dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : caractéristiques des lots des futurs géniteurs G0.

	futurs géniteurs G0 témoins	futurs géniteurs G0 sélectionnés
bassin de grossissement	N° G3	N° 6
nb PL issues du bac d'élevage larvaire 5 (1 femelle x 2 mâles)	200	0
nb PL issues du bac d'élevage larvaire 6 (9 femelles x 13 mâles)	742	29000
nb PL issues du bac d'élevage larvaire 8 (4 femelles x 7 mâles)	1009	0
nombre de femelles parentales	14	9
nombre estimé de mâles parentaux	22	13
densité initiale d'élevage (animaux/m ²)	1	20
date fin grossissement	21-jun-2000	06-jul-2000
Survie fin grossissement	96%	22%

Le fait que le pic de mortalité observé dans le bassin N°6 corresponde à la baisse de température du mois de juin (**figure 4**) laisse penser que la mauvaise survie (22%) est effectivement liée à un épisode de syndrome 93. L'évaluation de la pression de sélection qu'a subi ce lot est cependant délicate du fait que tous les bassins génétiquement équivalents et élevés à la même densité ont subi simultanément le syndrome 93 à des degrés variables (survie finale entre 28% et 47%).

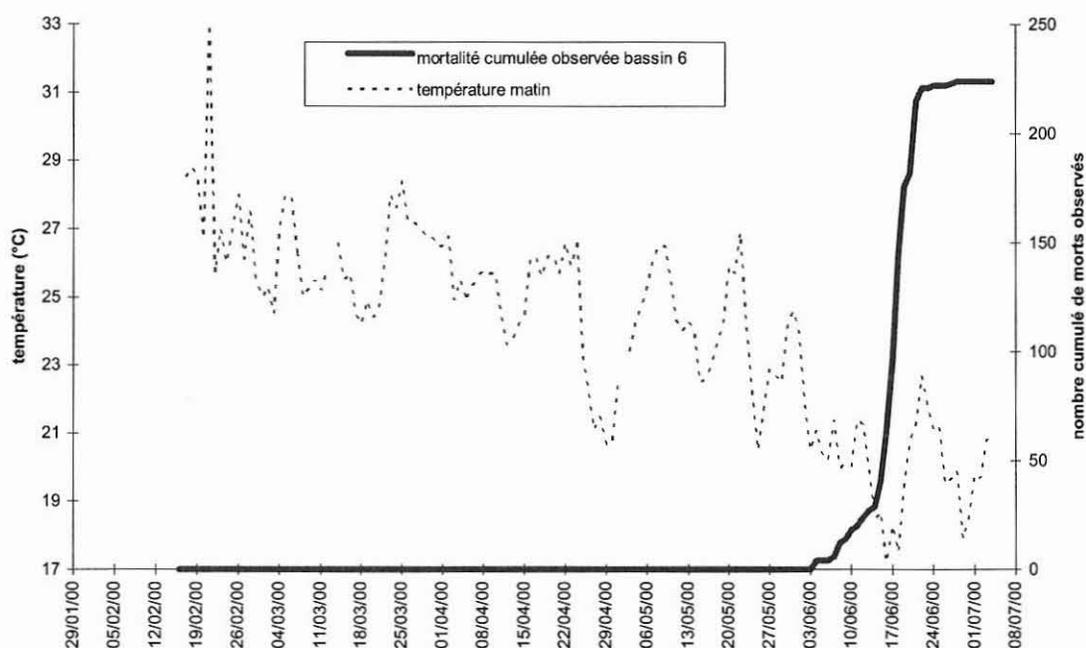


Figure 4 : suivi de température et de mortalité lors du grossissement des futurs géniteurs G0 sélectionnés

Production et gestion des G1 témoin et sélectionnée (2001)

En décembre 2000, les populations G1-témoin et G1-sélectionnée ont été produites, respectivement à partir de 13 et 15 bacs d'élevages larvaires multiparentaux différents (élevage larvaire ref 2000-05 ; Pham, 2001a), puis ont été prégrossies en 4 sous-populations chacune jusqu'à une taille compatible avec le marquage par injection de silicone coloré sous la carapace (**figure 5**).

Elles ont ensuite été réparties en 5 bassins de terre avant la saison froide :

- 1 bassin (D) de 4 x 200 futurs géniteurs témoin marqués (faible densité 1 animal/m² limitant les risques de syndrome 93)
- 1 bassin (B2) correspondant à 1 des sous-populations sélectionnées, (densité de l'ordre de 20/m² favorable au syndrome 93)
- 1 bassin (C1) correspondant aux 3 autres sous-populations sélectionnées, préalablement marquées (densité de l'ordre de 20/m²)
- 2 bassins supplémentaires (A2 et B1) d'individus sélectionnés marqués (faible densité) destinés à être infectés artificiellement en conditions contrôlées.

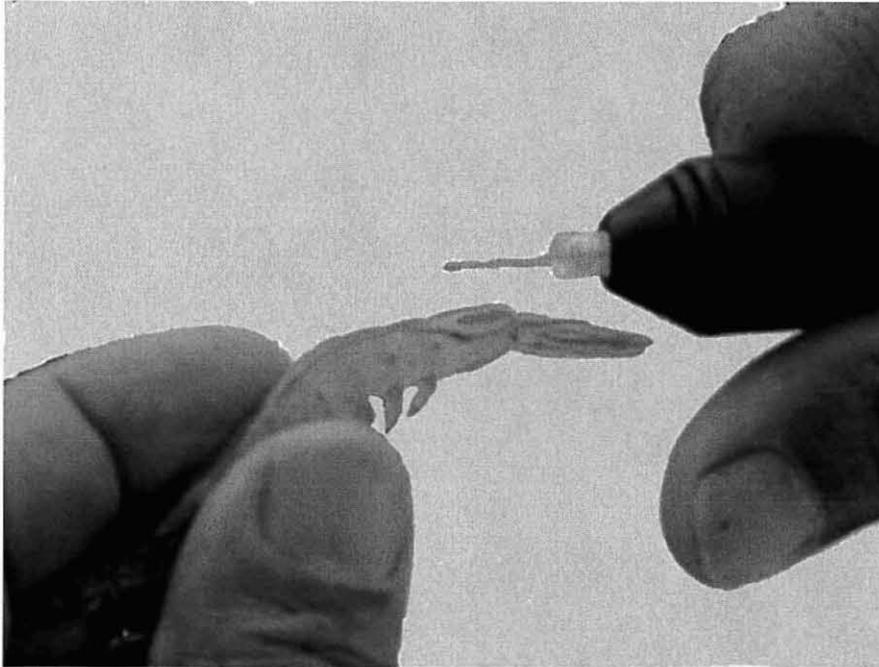


Figure 5 : marquage de juvéniles de crevette avant mélange des populations sélectionnée et témoin.

Des mortalités de type syndrome 93 ont été observées dans les bassins B2 et C1.

Le retard pris dans la construction de la salle d'infection expérimentale a conduit à abandonner l'idée d'exercer une pression de sélection sur la G1 par infection expérimentale et à éliminer les bassins A2 et B1 prévus à cet effet. Par mesure de sécurité et compte tenu de la possibilité de nouveaux retards dans les travaux de construction, il a été décidé de permettre d'exercer une pression de sélection en bassin de production sur la G2 à venir comme sur les générations précédentes. Les géniteurs G1 ont donc été pêchés fin octobre 2001 pour produire les G2 en novembre 2001.

Les survies enregistrées sont très faibles : 8% pour les bassins à forte densité utilisés pour exercer une pression de sélection sur les sous-populations G1-sélectionnées et 20% pour le bassin à faible densité utilisé pour maintenir la population G1-témoin. Une fragilité atypique des animaux a conduit à des mortalités en salle de maturation, si bien qu'on ne disposait plus au moment de l'épédonculation que de 96 géniteurs G1-témoins et de 272 G1-sélectionnés.

Production et gestion des G2 témoin et sélectionnée (2002)

L'intérêt d'avoir subdivisé chaque G1 en 4 sous-populations réside dans la possibilité d'éviter les croisements entre frères et sœurs puis entre cousins et cousines en suivant un plan de croisement adapté. Les populations G2-témoin et G2-sélectionnée ont été produites, respectivement à partir de 14 et 13 bacs d'élevages larvaires biparentaux différents (élevage larvaire ref 2001-05 ; Pham, 2001b), puis ont été prégressées en bassins terre en 4 sous-populations chacune jusqu'à une taille compatible avec le marquage par injection de silicone coloré sous la carapace.

Les G2 témoin et sélectionnée ont ensuite été réparties en 5 bassins de terre avant la saison froide :

- 2 bassins (B1 et B2) de 1000 futurs géniteurs G2-témoins marqués (faible densité de 2 animaux/m²)
- 3 bassins (A1, C1 et C2) de 8000 animaux sélectionnés marqués et 2000 animaux témoins (densité de l'ordre de 20/m² favorable au syndrome 93) permettant:
 - d'exercer une pression de sélection en bassin de terre sur la G2 sélectionnée,
 - de disposer d'animaux témoins et sélectionnés élevés dans des conditions équivalentes pour évaluer le progrès génétique réalisé.

Des mortalités de type syndrome 93 ont été observées à plusieurs reprises sur les bassins A1, C1 et C2. Un bassin de futurs géniteurs témoins (B1) a été intégralement perdu à la suite de la prolifération d'une anémone toxique, tandis qu'aucune mortalité n'a pu être observée dans le bassin B2.

Comme à la génération précédente, il a été décidé, par mesure de sécurité, de permettre d'exercer une pression de sélection en bassin de production sur la G3 à venir. Les géniteurs G2 ont donc été pêchés en novembre 2002 et transférés en salle de maturation pour produire les G3 en décembre.

Le bassin B2 n'a produit que 127 géniteurs (survie 13%) alors qu'aucune mortalité n'y a été observée. Selon toute vraisemblance les 87% de mortalité ne correspondent pas à une mortalité de type syndrome 93. Dans les 3 bassins à forte densité destinés à la production de géniteurs sélectionnés, la survie varie de 11% à 20%.

Production et gestion des G3 témoin et sélectionnée (2003)

Les populations G3-témoin et G3-sélectionnée ont été produites, respectivement à partir de 13 et 18 bacs d'élevage larvaires biparentaux différents (élevage larvaire ref 2002-05, données non publiées), puis ont été prégrossies en bassins terre en 2 sous-populations chacune jusqu'à une taille compatible avec le marquage.

Les populations G3 témoin et sélectionnée ont ensuite été réparties en 4 bassins de terre avant la saison froide :

- 2 bassins (B1 et B2) de 6700 animaux sélectionnés marqués et 3300 animaux témoins (environ 2200 marqués et 1100 non marqués) (densité de l'ordre de 20/m² favorable au syndrome 93) permettant:
 - de disposer d'animaux témoins et sélectionnés élevés dans des conditions équivalentes pour évaluer le progrès génétique réalisé en 3 générations,
 - d'exercer une pression de sélection en bassin de terre sur la G3 sélectionnée pour la poursuite des travaux.
- 2 bassins (A1 et C2) de 1000 futurs géniteurs G3-témoins marqués (faible densité de 2 animaux/m²) pour la poursuite des travaux.

Méthode d'évaluation de la réponse en termes de résistance

Les survies des populations sélectionnées et témoin ont été comparées à plusieurs reprises et dans différentes conditions :

- pour les secondes générations témoin et sélectionnée :
 - o des animaux témoins et sélectionnés (190 de chaque population), qui avaient été préalablement marqués avant d'être mélangés dans les bassins de grossissement à forte densité (A1, C1 et C2), ont été rapatriés en Avril 2002 en salle d'infection expérimentale (**figure 6**) et répartis en mélange dans 16 bacs de 200 litres à raison de 23-24 individus par bac. Trois traitements leur ont été appliqués (6 bacs infectés par baignade de 2 heures dans une suspension à $1,2 \cdot 10^4$ CFU/mL correspondant à la dose théorique DL50 et 6 bacs infectés par baignade de 2 heures dans une suspension à $12 \cdot 10^4$ CFU/mL correspondant à la dose théorique $10 \times$ DL50, 4 bacs de contrôle sans baignade). Les mortalités ont été suivies pendant 68 heures à l'issue desquelles un bilan de survie a été effectué.
 - o une expérience similaire a été rééditée en mai 2002 avec 50 animaux par population et deux traitements (baignade de 2 heures dans une suspension à $1,2 \cdot 10^4$ CFU/mL et absence de baignade)

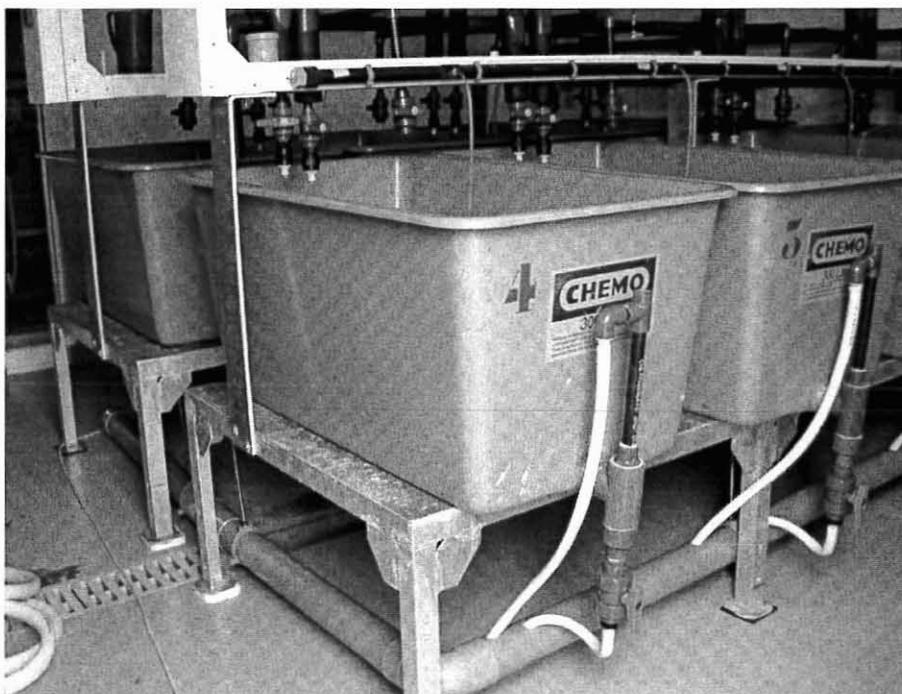


Figure 6 : Salle d'infection expérimentale

- pour les troisièmes générations témoin et sélectionnée :

- des animaux témoins et sélectionnés (235 de chaque population, poids moyen de l'ordre de 5 grammes), qui avaient été préalablement marqués avant d'être mélangés dans les bassins de grossissement à forte densité (B1 et B2), ont été introduits en Mars 2003 en salle d'infection expérimentale et répartis en mélange dans 16 bacs de 200 litres à raison de 30 individus par bac. Quatre traitements leur ont été appliqués (4 bacs infectés par injection intramusculaire à la seringue de 100 CFU/crevette, 4 bacs infectés par injection IM de 200 CFU/crevette, 4 bacs infectés par injection IM de 1000 CFU/crevette, 4 bacs de contrôle sans infection mais avec injection IM d'eau de mer stérile; **figure 7**). Les mortalités ont été suivies pendant 90 heures à l'issue desquelles un bilan de survie a été effectué.
- les animaux survivants des 2 populations G3 ont été dénombrés lors de la pêche finale des 2 bassinsensemencés à forte densité.

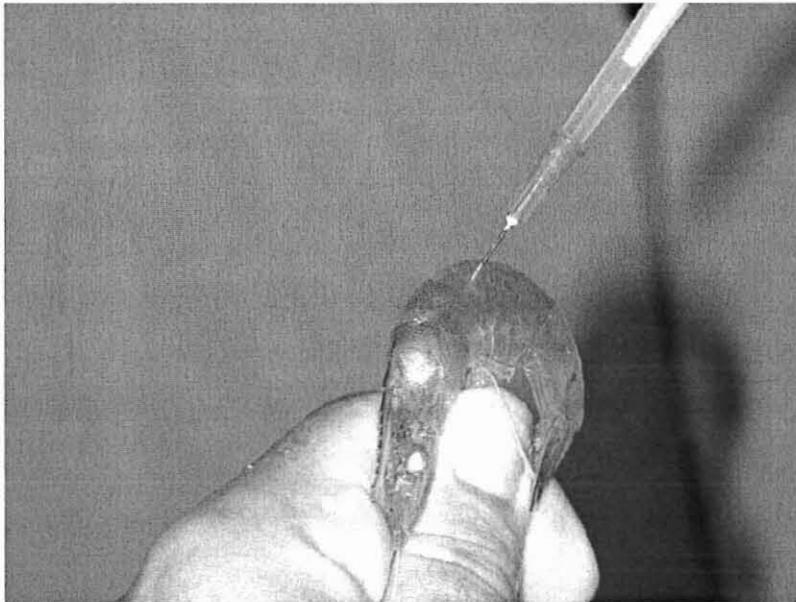


Figure 7 : Injection d'une suspension de *V. penaeicida*

Méthode d'évaluation de la réponse corrélée au niveau des effecteurs immunitaires

Matériel biologique et extraction d'ARN totaux

Des crevettes sélectionnées et témoins non sélectionnées de 3^{ème} génération préalablement marquées et élevées dans un environnement commun (bassins d'élevage à forte densité B1 et B2) ont été pêchées et transférées en salle d'infection expérimentale du LAC. Pour chaque population, 150 individus ont été infectés par balnéation avec *V. penaeicida* à la dose théorique de 1/10 DL50 afin de réaliser une infection qui stimule les mécanismes immunitaires de défense mais qui reste sublétales. Pour chaque population de

crevettes, des prélèvements d'hémocytes ont été réalisés à 4 moments différents (0, 10, 24 et 48 heures post infection) selon le **tableau 2**.

Tableau 2 : Nombre d'individus dont les hémocytes ont été prélevés après infection expérimentale

Heures post infection	Nombre d'individus par pool de prélèvement	
	Témoins	Sélectionnés
0	15	15
10	12	12
24	12	15
48	6	24

Les prélèvements d'hémocytes (**figure 8**) ont été regroupés pour disposer de suffisamment de matériel analysable et conservés dans du RNAlater (Ambion) pour effectuer les extractions d'ARN totaux au laboratoire DRIM de Montpellier. Pour les 8 échantillons (0, 10, 24 et 48 heures post infection, pour crevettes témoins et sélectionnées), les ARN totaux d'hémocytes ont été extraits en utilisant du Trizol reagent (BRL, Life technologies).

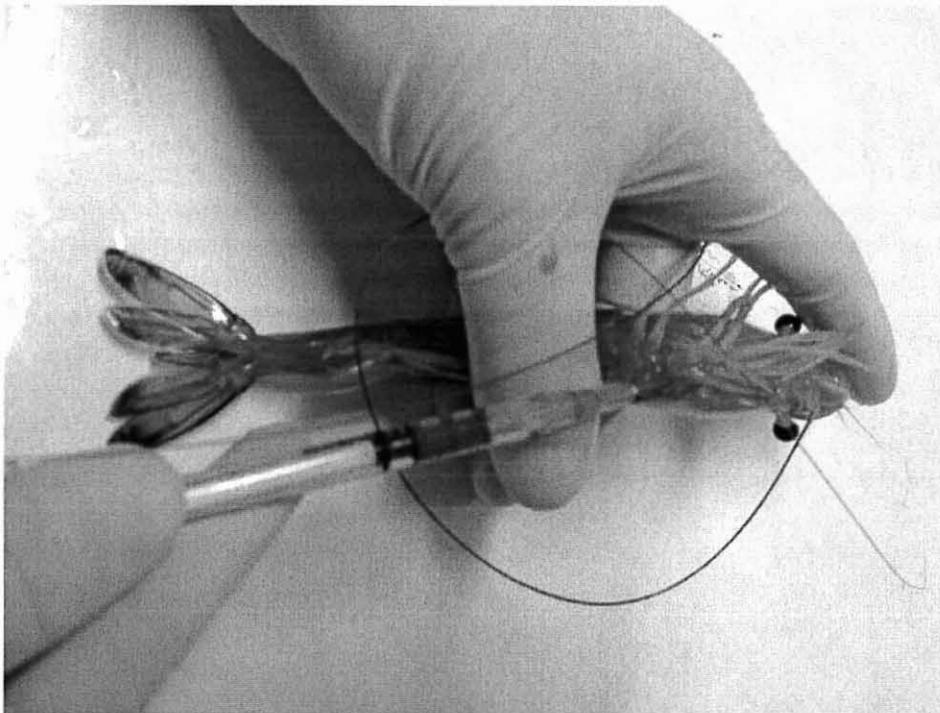


Figure 8 : ponction d'hémolymphe

Analyse de l'expression par Northern Blot

Les modulations des taux d'expression des gènes d'intérêts (penaeidine-3, lysozyme, profiline, annexine et transglutaminase) ont été analysées par la technique de Northern Blot. Ce type d'analyse quantitative permet de comparer les niveaux d'expression d'un gène donné entre différentes conditions expérimentales. Les gènes d'intérêt testés sont amplifiés par PCR à partir de clones issus de la banque soustractive puis radio-marqués pour être utilisés comme sondes. Pour les 8 échantillons (0, 10, 24 et 48 heures post infection, pour crevettes témoins et sélectionnées), 7 µg d'ARN totaux sont fractionnés par électrophorèse dans un gel dénaturant (1,2 % agarose/formaldehyde) puis transférés sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) et fixés sur la membrane sous ultraviolet. Cette membrane est pré hybridée à 65°C pendant 2 heures dans une solution de pré hybridation dénaturante (50% formamide, 5X SSC, 8X Denhardt's, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6.5), 0.1% SDS et 100 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé) afin de bloquer les sites d'hybridation non spécifiques. La sonde radio marquée est ensuite ajoutée au tampon de pré hybridation et incubée 12 heures à 42°C. Après hybridation, la membrane est lavée deux fois 15 minutes à température ambiante dans une solution de lavage I (2X SSC, 0.1% SDS) et deux fois dans une solution de lavage II (1X SSC, 0.1% SDS). Finalement, la membrane est auto radiographiée et les signaux d'hybridation pour chaque condition sont quantifiés à l'aide du système STORM (Molecular Dynamics).

Cependant, afin de vérifier l'homogénéité des quantités d'ARN totaux entre les échantillons comparés, il faut normaliser chaque signal par le signal d'hybridation d'un gène non modulé. Pour cela, les ADN complémentaires de l'actine et du facteur d'élongation-1, couramment utilisés comme contrôles d'expression constitutive dans d'autres modèles, ont été isolés chez *L. stylirostris*. Ces deux gènes sont utilisés comme sondes dans les mêmes conditions que les autres gènes et leurs signaux d'hybridation sont quantifiés. Cependant, la normalisation à l'aide de l'actine paraît la moins fiable à la vue de la forte proportion de gènes impliqués dans le remodelage cellulaire au niveau de la banque soustractive. En effet, les phénomènes de remodelage sont en forte interaction avec l'actine, ce qui laisse penser que l'actine pourrait être légèrement modulée au cours de l'infection. Pour cette raison, la normalisation par le facteur d'élongation-1 paraît plus pertinente.

L'analyse par Northern Blot permet de connaître les modulations transcriptionnelles d'un seul gène à la fois. Cependant, il est possible d'analyser successivement plusieurs gènes sur la même membrane en décrochant la sonde par deux bains dans du SDS 0,1% bouillant. Ainsi, les niveaux d'expression de sept gènes sur la même membrane (5 gènes d'intérêts et 2 contrôles d'expression) ont pu être analysés sur la même membrane.

Résultats-Discussion

Résultats des infections expérimentales par baignation sur les G2

Les 3 traitements qui ont été appliqués lors de la première série d'infection (pas d'infection, infection expérimentale à DL50 et infection expérimentale à 10xDL50) ont provoqué des mortalités massives respectives de 46%, 81% et 95% toutes lignées confondues (figure 9). En fait, sur ces crevettes, *a priori* porteuses de *V. penaeicida* comme la majorité des crevettes calédoniennes, le stress de manipulation a été suffisant pour déclencher des mortalités de type Syndrome 93, y compris sans baignation à *V. penaeicida*, typiques d'une population affaiblie en période à risque de Syndrome 93. Chez les animaux n'ayant pas subi de baignation, les différences de survie entre population témoin et population sélectionnée (respectivement 42% et 65%) sont significatives ($p < 0,01$). Chez les animaux ayant subi une baignation à DL50 ou à 10xDL50, les différences de survies ne sont pas significatives entre populations témoin et sélectionnée.

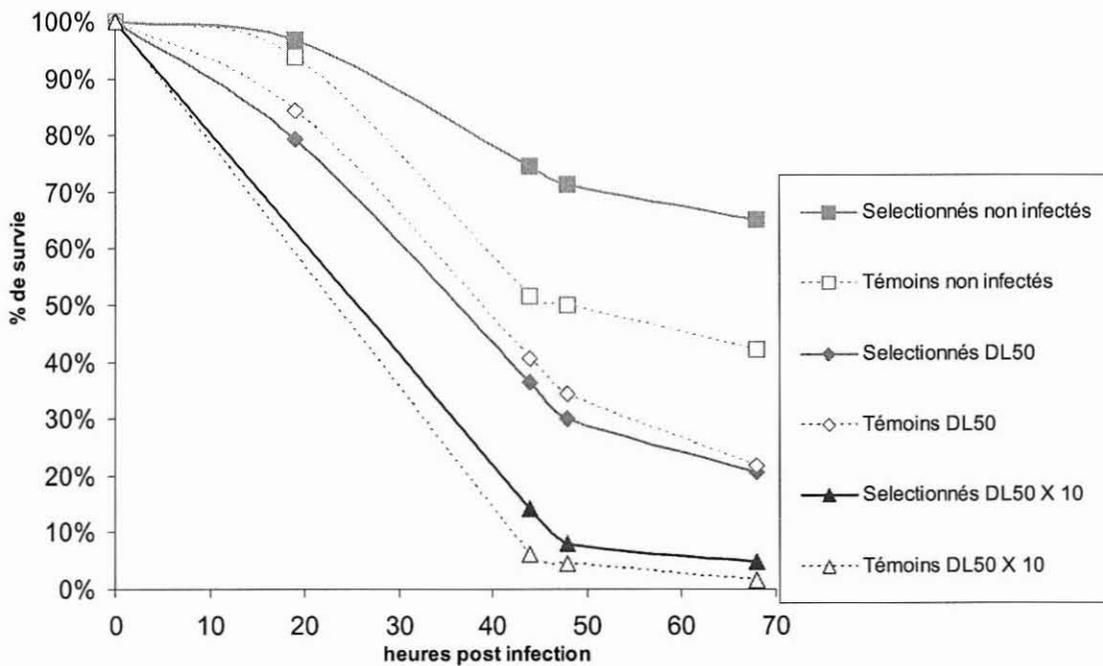


Figure 9 : Survie post infection des populations G2 témoin et sélectionnée

Ce résultat encourageant n'a pas été confirmé dans la seconde série d'infections effectuée sur les G2 et pour laquelle la mortalité à 72 heures avoisinait 80% sans différence significative ni entre lignées ni entre traitements.

Résultats sur les G3

Survie aux infections expérimentales par injection

Les courbes de survie des 2 populations soumises à 4 doses infectantes sont données dans la **figure 10** ; il apparaît que :

- les animaux n'ayant pas subi d'injection de *V. penaeicida* n'ont pas été affectés par les manipulations (survie témoins : 100%, survie sélectionnés : 98%, écart non significatif).
- les survies à 90 heures des sélectionnées injectées sont significativement supérieures à celles des témoins injectés à 100, 200 ou 1000 CFU/animal (valeurs moyennes : 84% contre 70% ; $p < 0,01$).
- les survies à 90 heures des sélectionnées sont significativement supérieures à celles des témoins pour le traitement à 100CFU/animal (95% contre 75% ; $p < 0,01$) et la même tendance (non significative au seuil de $p = 0,05$) est observée pour le traitement à 200 CFU/animal (81% contre 69%) et pour le traitement à 1000 CFU/animal (78% contre 68%)

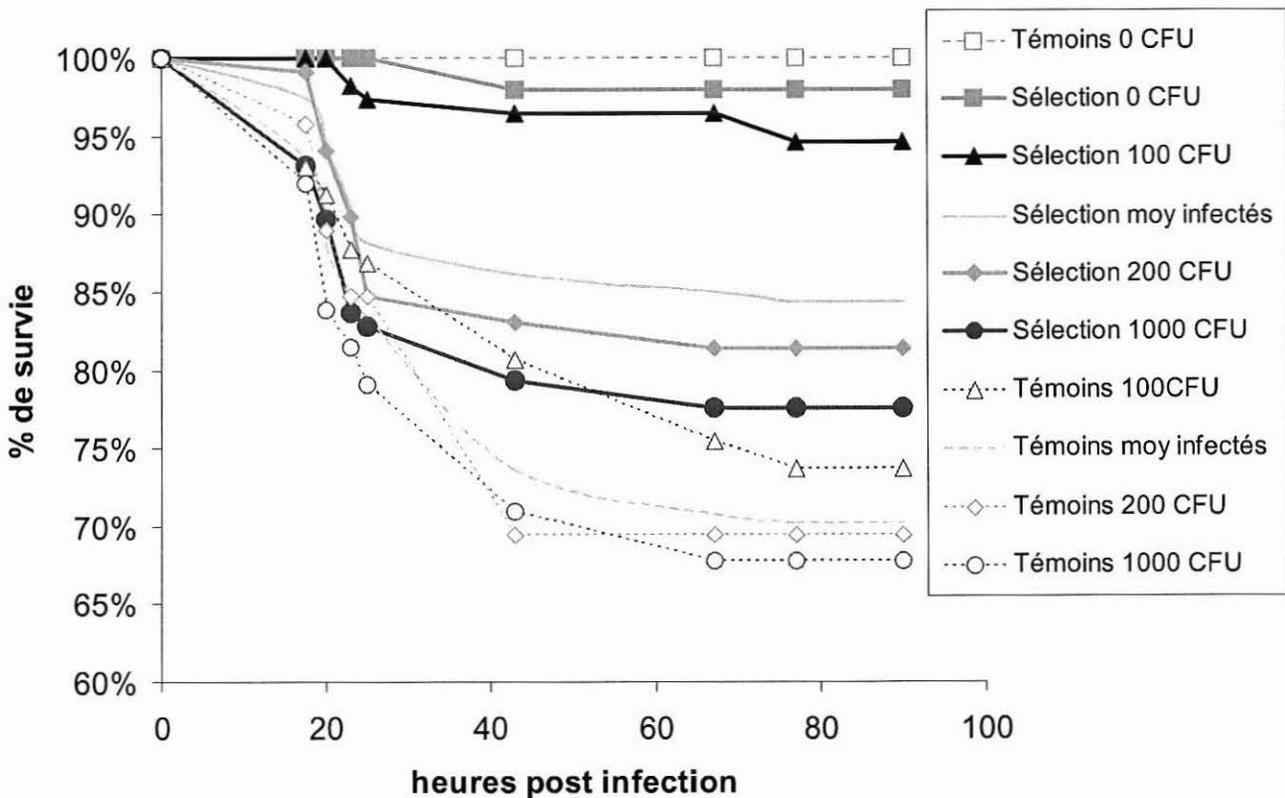


Figure 10 : Survie post infection des populations G3 témoin et sélectionnée

Survie en bassins de production

Le **tableau 3** récapitule les effectifs des bassins B1 et B2 à l'ensemencement et à la pêche finale, ainsi que le nombre d'animaux prélevés en cours d'élevage.

Tableau 3 : effectifs initiaux, prélevés et finaux des populations G3 sélectionnée et témoin en bassins d'élevage

	bassin B1			bassin B2		
	sélectionnés	témoins		sélectionnés	témoins	
	marqués	marqués	non marqués	marqués	marqués	non marqués
Nombre initial	6676	2200	1125	6712	2200	1088
Nombre d'individus prélevés en cours d'élevage	202	213	0	202	213	0
Nombre individus repêchés	1865	464	275	1518	665	213

Pour les individus sélectionnés, le calcul de la survie est rendu imprécis à cause des prélèvements qui ont été effectués en cours d'élevage. Si on néglige ces prélèvements, le calcul de la survie par la formule nombre repêché / nombre initial / fournit un estimateur pessimiste de la survie du lot dans le bassin. La survie des sélectionnés est donc estimée, de façon pessimiste à au moins 28% et au moins 23% respectivement pour les bassins B1 et B2.

Le calcul de la survie globale des témoins (marqués + non marqués) est imprécis pour les mêmes raisons que pour les individus sélectionnés. Mais la survie des témoins peut être calculée de façon précise chez les individus témoins non marqués puisque aucun individu de ce type n'a été prélevé au cours de l'élevage. La survie des témoins non marqués est de 24% et 20% respectivement pour les bassins B1 et B2.

Dans les 2 bassins, la survie estimée des sélectionnés est significativement supérieure à celle des témoins non marqués (au seuil de $p=0,05$). Elle correspond à une augmentation du nombre de survivants de 16% et 14% respectivement pour les bassins B1 et B2.

Immunologie comparée des populations témoin et sélectionnée

Pour chaque gène étudié (penaeidine-3, lysozyme, profiline, annexine et transglutaminase), la **figure 11** présente les niveaux d'expression normalisés sur l'actine et sur le facteur d'élongation-1 (EF1), au cours de l'infection pour des crevettes sélectionnées et témoins. L'absence de données individuelles ne permet pas de rendre compte des variations inter-individuelles et d'évaluer la significativité des différences observées.

En premier lieu, la cinétique d'expression de la pénaeidine-3 permet de confirmer la réussite de l'infection (diminution à 10 heures puis remontée au taux de base – Munoz *et al.*, 2002).

L'analyse de l'expression des gènes d'intérêt permet d'une part d'évaluer leur modulation au cours de l'infection. Deux types de modulation sont observés :

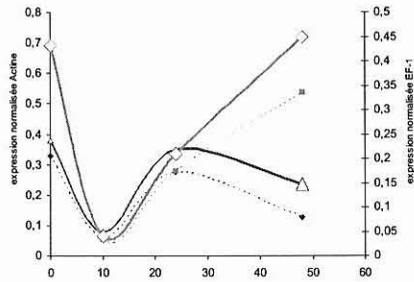
- le nombre de transcrits des antimicrobiens (penaeidine-3 et lysozyme) chute au même moment puis remonte à 24-48 heures post infection.
- les gènes impliqués dans le remodelage cellulaire (profiline et annexine) sont au contraire modulés vers le haut lors de l'infection, avec une légère augmentation du taux d'expression 10 heures post infection.
- la transglutaminase quant à elle, présente une expression apparemment faiblement modulée.

Elle permet également la comparaison entre les profils d'expression de crevettes sélectionnées et ceux de crevettes témoins non sélectionnées :

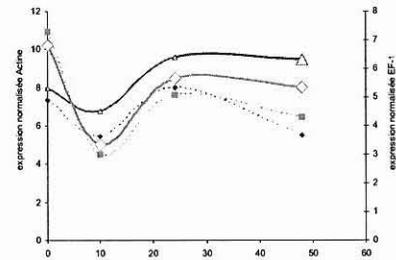
- le niveau d'expression du lysozyme est supérieur chez les sélectionnées avant infection, et cette différence, d'un facteur 2, se retrouve post infection, quelle que soit la méthode de normalisation employée ;
- le niveau d'expression de la pénaeidine-3 est supérieur chez les sélectionnées avant infection, mais cette différence s'inverse après infection ;
- cette différence de taux d'expression basal entre sélectionnées et non sélectionnées se retrouve aussi pour l'annexine avec une normalisation avec l'actine, mais cela n'est pas confirmé par la méthode de normalisation avec l'EF1 ;
- la transglutaminase semble plus exprimée chez les sélectionnées après infection mais pas avant, ce qui en fait un mauvais critère de sélection ;
- aucune tendance ne se dégage pour la profiline.

Une réponse corrélée à la sélection sur un critère de survie semble donc être observée en 3^{ème} génération sur le niveau d'expression en lysozyme.

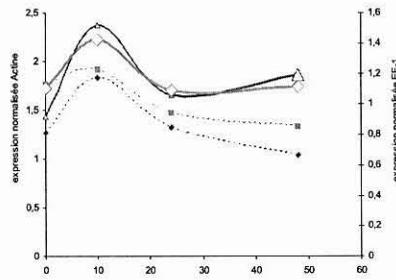
Lysozyme



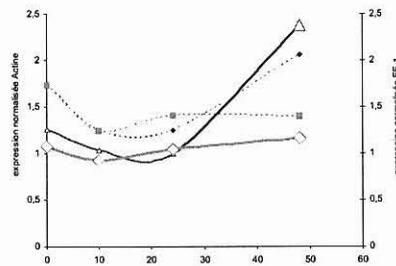
Penaéidine



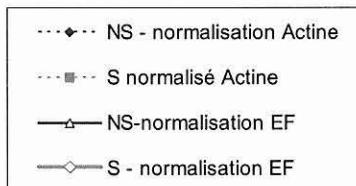
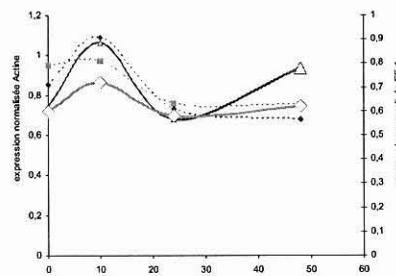
Annexine



Transglutaminase



Profiline



Heures post-infection

Figure 11 : Évolution des niveaux d'expression des 5 gènes étudiés chez la population sélectionnée (S) et la population témoin non sélectionnée (NS), normalisées par l'actine et par l'Elongation Factor 1

Conclusion

Malgré la rusticité de la technique de sélection mise en œuvre dans ce travail, un gain significatif de survie en saison froide semble pouvoir être obtenu au sein de la population calédonienne. Le nombre d'individus survivants aux épisodes de mortalité à *V. penaeicida* a en effet été augmenté d'environ 15-20% en 3 générations. De plus, la population améliorée expérimentale montre des niveaux d'expression en lysozyme supérieurs à ceux de la population témoin, ce qui suggère que la concentration en lysozyme dans l'hémolymphe pourrait être un critère de sélection dans le cadre d'un programme plus ambitieux qui ne pourra se satisfaire des aléas des pressions de sélection en conditions de production. Une technique colorimétrique pourrait d'ailleurs être adaptée aux conditions d'un laboratoire de terrain afin de mesurer rapidement et sur un grand nombre de candidats à la reproduction la concentration en lysozyme (Allam et Paillard, 1998).

A court terme, il conviendra de confirmer à la quatrième génération les résultats obtenus, et de vérifier si la sélection a affecté, positivement ou négativement, d'autres caractères d'intérêt vitaux pour la filière (croissance, performances reproductrices, le cas échéant qualité organoleptique). Il sera également utile de comparer les niveaux de prévalence de *V. penaeicida* au sein des populations sélectionnée et témoin afin de déterminer s'il s'agit d'une véritable résistance (prévalence plus faible chez les sélectionnées) ou plutôt d'une meilleure tolérance (prévalence équivalente). L'exploitation commerciale de la population expérimentale pourrait être envisagée, mais certaines précautions devront être prises compte tenu de l'étroitesse de sa base génétique liée au fait que cette expérience n'a pas été conçue pour produire une population améliorée pérenne, à base génétique optimisée. Ces précautions pourront être intégrées au cahier des charges de l'UPRAC (Unité de Promotion des Races Aquacoles de Crevettes), nouvelle structure professionnelle calédonienne dont la vocation est d'intégrer une démarche génétique raisonnée au sein de la filière crevette.

A moyen terme, ces travaux devront être complétés par la comparaison des performances de survie de la souche hawaïenne de *L. stylirostris*, dont l'introduction préconisée par l'Ifremer (Goyard et al., sous presse) est programmée par l'UPRAC fin 2004, avec celles de la souche calédonienne et avec celles de leurs hybrides.

A plus long terme, pourrait être envisagée une sélection expérimentale sur le critère de concentration en lysozyme dans l'hémolymphe, la réponse à la sélection étant évaluée sur le caractère de survie à *V. penaeicida*.

Annexe

Adaptation du protocole d'infection expérimentale de *Litopenaeus stylirostris* avec *Vibrio penaeicida* en Nouvelle-Calédonie : facteurs limitants pour une utilisation en sélection génétique.

Afin de disposer d'un outil permettant l'étude de la maladie à *V. penaeicida*, l'IFREMER a développé au Laboratoire d'Aquaculture Tropicale (LAT) de Tahiti un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves (*i.e.* n'ayant jamais été en contact avec ce pathogène). Ce modèle utilise une voie d'infection respectant l'intégrité de l'animal puisqu'il repose sur une balnéation des crevettes dans une suspension bactérienne. La standardisation des conditions expérimentales a permis d'obtenir une dose létale pour 50% des crevettes infectées (DL50) reproductible, par une balnéation de 2 heures dans une suspension à $1,2 \cdot 10^4$ CFU/mL (Saulnier *et al.*, 2000). Cet outil est désormais bien maîtrisé au LAT.

Son application au Laboratoire d'Aquaculture de Calédonie a donc été entreprise, d'une part en respectant les conditions expérimentales standardisées développées au LAT, d'autre part en recherchant les conditions d'infection sur des crevettes de petite taille (2 à 3 grammes de poids moyen) permettant d'obtenir une dose létale à 90% des animaux infectés. Cette infection aurait ainsi été utilisée comme pression de sélection dans le cadre de la sélection d'une lignée plus résistante au Syndrome 93. Des difficultés ont été rencontrées dans l'application et l'adaptation de cette technique :

- De fait, la souche de *L. stylirostris* élevée en Calédonie n'est pas une souche naïve vis-à-vis du pathogène considéré (*V. penaeicida*) mais est déjà fréquemment porteuse puisque la prévalence moyenne observée chez les juvéniles est de 64% (Goarant *et al.*, 2003). Ainsi, sa sensibilité à l'infection expérimentale est nécessairement modifiée par cet état de portage préalable. En effet, il a pu être montré à l'aide d'infections expérimentales répétées que le portage asymptomatique du pathogène conférait à la crevette une certaine « immunité de prémunition » face à une nouvelle infection par ce même agent (Saulnier *et al.*, 2003).
- De plus, les conditions climatiques diffèrent considérablement entre les deux territoires : la température de l'eau d'élevage des crevettes en Polynésie varie très peu au cours des saisons, oscillant autour de l'optimum thermique de *L. stylirostris*. Ainsi, les crevettes utilisées en Polynésie pour la mise au point du modèle d'infection sont d'une certaine manière extrêmement « normalisées » par le fait de ces conditions d'élevage très peu variables. A l'opposé, en Nouvelle-Calédonie, cette température atteint des valeurs extrêmement basses pour la biologie de l'espèce, puisque des valeurs de 19°C sont observées chaque année dans les bassins d'élevage. Or, cette température basse joue d'une part sur la virulence du pathogène *V. penaeicida* (Goarant *et al.*, 2000), d'autre part sur divers critères physiologiques et immunitaires de la crevette (Le Moullac et Haffner, 2000 ; Lemaire *et al.*, 2002 ; Chim *et al.*, 2003). Une température basse est d'ailleurs le facteur déclenchant majeur du Syndrome 93 en bassins (Goarant *et al.*, 1996).

Ainsi et selon les saisons et la température du bassin d'élevage dont elles proviennent, les crevettes de Nouvelle-Calédonie sont :

- soit beaucoup plus résistantes que les crevettes naïves et « normalisées » de Polynésie au cours de la saison chaude calédonienne et résistent bien à l'infection expérimentale,
- soit au contraire extrêmement fragiles et susceptibles de déclarer une infection naturelle par le seul fait d'un stress de capture et de transfert dans les bacs de la zone de pathologie expérimentale au cours de la saison fraîche calédonienne.
- aux intersaisons ou lors de variations de température importantes, leur sensibilité est relativement imprévisible...

La survie aux infections expérimentales apparaît donc comme inexploitable en tant que critère de sélection, au moins dans l'état actuel des connaissances, car les pressions de sélection ne peuvent être standardisées : selon les conditions environnementales pré-infection, on risque d'appliquer soit une pression de sélection trop faible (et donc par définition inefficace), soit une pression de sélection trop forte (avec le risque associé de ne pas pouvoir reproduire la population sélectionnée par manque de géniteurs). Il a donc été décidé d'étudier un certain nombre d'indicateurs physiologiques ou immunitaires susceptibles de permettre, *a priori*, de prévoir la sensibilité d'un lot de crevettes à une infection expérimentale. Ces travaux sont en cours, en lien avec les autres actions menées en physiologie et immunologie au LAC. Leur achèvement pourrait permettre de reprendre la mise au point d'une technique d'infection permettant de provoquer, de façon fiable et reproductible, 80 à 90% de mortalité des crevettes qui y sont soumises, dans l'optique de l'utiliser comme critère de sélection génétique.

La technique d'infection expérimentale est cependant utilisable en tant qu'outil d'évaluation de la résistance d'animaux élevés dans des conditions environnementales similaires (et donc, par exemple, pour comparer des animaux issus de populations génétiquement différentes), dans la mesure où, dans ce cas, on ne s'intéresse qu'au résultat statistique et où il n'y a pas de contrainte en termes de « production » d'animaux survivants destinés à la reproduction.

Bibliographie

- Allam B., Paillard, C. (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* **33**: 123–128.
- Aquacop (1979). Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proceedings of the 10th Annual Meeting of World Mariculture Society 10: 445-452.
- Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M., Moss S.M. (2000). Selective breeding of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrom Virus, In Book of abstracts, International Symposium for Genetic in Aquaculture, Townsville, Australia, 15-22/07/2000, p. 6.
- Bédier E., Patrois J., Aquacop (1996). Genetic enhancement of the *Penaeus stylirostris* Aquacop SPR43 strain. Divergent selection for growth: preliminary results. In Books of Abstracts, SICPPS, SEAFDEC/AQD, Iloilo, Philippines, May 1996 : p. 60.
- Chim L., Galois R., Martin J-L., Lemaire P., Wabete N., Massabuau J-C., Cuzon G. (2003) Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la composition et la distribution des aliments en relation avec les saisons d'élevage. Book of abstracts « Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie », colloque du 2 au 6 juin 2003. Page 18.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorselaer A., Rodriguez J., Bachere E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* **272**(45): 28398-406.
- Diatchenko L., Lau Y-F., Campbell A-P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E-D., Siebert P-D.(1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93** (12): 6025-30.
- Goarant C., Mermoud I., Costa R., Haffner P., Boglio E. (1996) Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia: I. Biotechnical impact and gross signs in diseased prawns. In: World Aquaculture Society Ed. , World Aquaculture '96. Book of abstracts of The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society, 29 January–2 February 1996, Bangkok, Thailand, pp. 139-140.
- Goarant C. , Herlin J. , Brizard R. , Marteau A.L. , Martin C. , Martin B. (2000) : Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**: 101-107.
- Goarant C., Herlin J., Ansquer D. (2003) *Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives. Book of abstracts « Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie », colloque du 2 au 6 juin 2003. Page 37
- Goyard E., Patrois J., Peignon J.M., Vanaa V., Dufour R., Viallon J., Bédier E. (2001). Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. *Aquaculture* **204** (3-4): 461-468.
- Goyard E., Arnaud S., Vonau V., Bishoff V., Mouchel O., Pham D., Wyban J., Boudry P., Aquacop (sous presse) Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New-Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations, Accepté dans *Aquatic Living Resources*.
- Hetzel D.J.S., Crocos P.J., Davis G.P. , Moore S.S., Preston N.C. (1999). Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **181** : 215-223.
- Iwanaga S., Kawabata S. (1998). Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front Biosci.* **3**:D973-84.

- Johansson M-W., Keyser P., Sritunyalucksana K., Söderhäll K.** (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* **191**: 45-52.
- Kang H.M., Choi K.S., Kassam G., Fitzpatrick S.L., Kwon M., Waisman D.M.** (1999). Role of annexin II tetramer in plasminogen activation. *Trends Cardiovasc. Med.* **9(3-4)**:92-102.
- Le Moullac G., Haffner P.** (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* **191**: 121-131.
- Lemaire P., Bernard E., Martinez-Paz JA., Chim L.** (2002) Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* **209**: 307-317.
- Lucien-Brun H.** (2001). Shrimp farming in New-Caledonia: Successful, integrated Industry. *Global Aquac. Advocate* **4 (5)**: 63-64.
- Mermoud I. , Costa R. , Ferré O. , Goarant C. , Haffner P.** (1998). Syndrome 93 in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris* : history and description of the three major outbreaks. *Aquaculture* **164** : 323-335.
- Munoz M., Vandembulcke F., Saulnier D., Bachere E.** (2002). Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* **269 (11)**: 2678-89.
- Pham D. (2001a).** Production éclosion 00-05: production de la G1 témoin et de la G1 sélectionnée L. stylirostris sur la résistance à *V. penaeicida*. Fiche biotechnique IFREMER-LAC 2001-07.
- Pham D. (2001b).** Production éclosion 01-05: production de la G2 témoin et de la G2 sélectionnée sur la résistance à *V. penaeicida*. Fiche biotechnique IFREMER-LAC 2001-10.
- Saulnier D., Avarre J-C., Le Moullac G., Ansquer D., Levy P., Vonau V.** (2000). Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**:109-115
- Saulnier D., Goarant C., Charlier J., Ansquer D., Levy P., Labreuche Y., de Lorgeril J., Bachère E., Aguirre-Guzman G., Cochennec-Laureau N.** (2003). Intérêts d'un modèle d'infection de crevettes naïves par une bactérie pathogène, *Vibrio penaeicida* : étude de la pathogénie ; confirmation et caractérisation de facteurs de virulence et recherche des mécanismes de défense de l'hôte. Book of abstracts « Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie », colloque du 2 au 6 juin 2003. Page 39.
- Smith L.C., Britten R.J., Davidson E.H.** (1995). Lipopolysaccharide activates the sea urchin immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **19 (3)**: 217-24.
- Weppe M., Bonami J.R., Lightner D.V., Aquacop** (1992). Demonstracion de la altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris*. (SPR 43) resistente al virus IHHN. Memorias Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. CENAIM, November 1992, Guayaquil, Ecuador, 229-232.
- Wyban J., Swingle J.** (1999). Selective breeding for fast growth and Taura Syndrome resistance in High Health *P. Vannamei*. In Book of abstracts, WAS 1999, Sydney, Australia.
- Yu K.H., Kim K.N., Lee J.H., Lee H.S., Kim S.H., Cho K.Y., Nam M.H., Lee I.H.** (2002). Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev. Comp. Immunol.* **26 (8)**: 707-13.

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB pages
RA-2003-01	RA	LCM Sète	Hamon P.Y., C. Vercelli, Y. Pichot, F. Lagarde, P. Legall, J. Oheix	Les malaigues de l'étang de Thau; Tome 1. Description des malaigues, moyens de lutte, recommandations	janv	libre	64
RA-2003-02	RA	LAC Nouvelle Calédonie	Goarant C., D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, A.L. Marteau	Bases des connaissances sur l'épidémiologie de <i>Vibrio nigripulchritudo</i> , agent étiologique du "Syndrome d'été" chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie	février	libre	27
RA-2003-03	RA	LCB La Trinité sur Mer	Fleury P.G., F. Cornette, S. Claude, H. Palvadeau, S. Robert, F. d'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli, S. Pien	REMORA Résultats des stations nationales, année 2001	mars	libre	48
RA-2003-04	RA	LCB La Trinité sur Mer	Fleury P.G., C. Simonne, S. Claude, H. Palvadeau, P. Guilpain, F. d'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli, S. Pien	REMORA Résultats des stations nationales, année 2002	mars	libre	49
RA-2003-05	RA	LAT Tahiti	Vonau V., C. Rouxel, D. Saulnier, N. Cochenne-Laureau, G. Nedelec et E. Goyard	Génotypage des géniteurs de <i>Lates calcarifer</i> de Tahiti: aide à la domestication raisonnée du Loup Tropical pour la filière Tahitienne	avril	libre	20
RA-2003-06	RA	LCPC La Tremblade	Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, S. Robert, S. Taillade et A. Doner	Contributions du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au défi MOREST en 2002	mai	libre	37
RA-2003-07	RA	RA, Brest	Coordination Jean BARRET	Publication 2002 du Département des Ressources Aquacoles	juin	libre	163
RA-2003-08	RA	LCM Sète	Le Gall P., F. Lagarde, Y. Pichot, H. Grizel, P.Y. Hamon et C. Vercelli	REseau Mollusques des Rendements Aquacoles de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> sur les côtes françaises (REMORA). Résultats des stations nationales et régionales dans l'étang de Thau pour l'année 2002	juin	libre	35
RA-2003-09	RA	LCPC La Tremblade	Faury N.(coord.), P. Geairon, J. Moal, S. Pouveau, D. Razet, M. Ropert, P. Soletchnik	Les analyses biochimiques de Protéines Lipides Glucides dans la chair des coquillages. Table ronde Ifremer Nantes 11 mars 2003	septembre	libre	99
RA-2003-10	RA	LCN Port en Bessin	Simonne C., S. Pien, J.L. Blin, V. Huguonnet, E. Le Gagneur, M. Ropert, J. Kopp, O. Richard	Remonor. Résultats 2002. Evaluation de la mortalité, croissance et qualité des huîtres creuses	septembre	libre	52
RA-2003-11	RA	LCN Port en Bessin	Ropert M., C. Simonne, V. Huguonnet, E. Le Gagneur, J. Kopp	Contributions du Laboratoire Conchylicole de Normandie au défi MOREST en 2002	septembre	libre	65
RA-2003-12	RA	LCPL Bouin	Haure J., O. Durin, H. Palvadeau, M. Papin, M. Nourry, C. Pénisson, J.L.M. Martin et J.L.Y. Martin	L'amélioration de la qualité des huîtres à échelle professionnelle: intégration de l'eau salée souterraine traitée comme milieu d'élevage	novembre	libre	31
RA-2003-13	RA	Département	Gérard A., J.P. Baud, Y. Harache, D. Lacroix, J.F. Samain et B. Vidal Giraud	Prospective sectorielle aquaculture	novembre	restreinte	25
RA-2003-14	RA	LAC Nouvelle Calédonie	Goyard E., C. Goarant, E. Bachère, J. de Lorgeril, C. Mugnier, D. Ansquer, F. Broutoi, P. Brun, F. Imbert, C. Justou, J.R. Maillez, J. Patrois, D. Pham, J.M. Peignon	Amélioration génétique expérimentale de la crevette d'élevage de Nouvelle-Calédonie: sélection d'une population de <i>L. stylirostris</i> résistante à la bactérie pathogène <i>Vibrio penaeicida</i>	novembre	libre	25