

Sophie De Decker

juillet 2004

**Résistance de la crevette *Litopenaeus stylirostris*
à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida* :**

**Physiologie, immunologie et pathologie comparées
d'une population sélectionnée sur un critère de survie
aux épisodes de mortalité et d'une population témoin
non sélectionnée.**

Rapport de stage de DEA
Exploitation Durable des Ecosystèmes Littoraux
EDEL - Université de La Rochelle

Responsables de stage :
Cyrille Goarant, Emmanuel Goyard et Chantal Mugnier

Sophie De Decker

**Résistance de la crevette *Litopenaeus stylirostris*
à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida* :**

Physiologie, immunologie et pathologie comparées d'une population sélectionnée sur un critère de survie aux épisodes de mortalité et d'une population témoin non sélectionnée.

Responsables de stage :
Cyrille Goarant, Emmanuel Goyard et Chantal Mugnier

Rapport de DEA
Exploitation Durable des Ecosystèmes Littoraux
EDEL - Université de La Rochelle
juillet 2004

A Frédéric,
A Romain,
Au baobab et à la smala.

Remerciements

Je remercie vivement Yves Harache, pour m'avoir accueillie au Laboratoire d'Aquaculture de Calédonie qu'il dirige et pour m'avoir permis de réaliser ce stage de DEA dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes responsables de stage Cyrille Goarant, Emmanuel Goyard et Chantal Mugnier, pour leur présence et leur soutien motivants, leur confiance, leurs conseils et critiques constructifs, ainsi que Dominique Ansquer pour sa gentillesse et sa patience touchante à m'initier à toutes ces techniques de laboratoire. Ils savent combien ils m'ont appris.

Je remercie Hugues Lemonnier pour toutes les discussions échangées, pour son plaisir à partager ses idées et pour sa présence réconfortante lors de ma soutenance, et Anne-laure Marteau pour savoir animer avec un humour « choc » l'ambiance de notre bureau. Je tiens également à remercier Jacky Patrois et Jean-Marie Peignon pour leurs précieuses corrections de rapport, et Alain Herbland pour ses conseils avisés, sa bienveillance et son plaisir à partager son expérience.

Merci également à toute l'équipe logistique et administrative sans laquelle rien de tout cela n'aurait été possible.

Un grand merci aussi à l'équipe zootechnique, Dominique, Pierre, Jacky, Jean-Marie, Lanlan, Channel, Jean-René, Francis et Prissyliia pour leur aide précieuse et à tous les agents de la station pour leur accueil, leur enthousiasme et leurs secrets gastronomiques.

Je pense également à toutes les personnes, chercheurs, techniciens, stagiaires, thésards, administratifs, pêcheurs et agriculteurs, que j'ai rencontrés durant mon séjour en Nouvelle-Calédonie et qui ont contribué pour une grande part à le rendre très beau.

Merci enfin à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de partager des petits bouts de vie sur cette grande île.

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 1980. La difficulté majeure que rencontre la filière depuis une dizaine d'années est la récurrence du « Syndrome 93 », qui s'exprime sous forme d'épisodes de mortalités lors des baisses de température aux intersaisons. Ces mortalités sont associées à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida*

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 avait montré des résultats très encourageants (survies améliorées de l'ordre de 20% lors d'infections expérimentales à *V. penaeicida*). Ces résultats ne sont pas confirmés en 4^{ème} génération et aucune différence en termes physio- et immunologique n'apparaît entre la population sélectionnée et la population témoin non sélectionnée. Les causes potentielles de ces résultats sont examinées et des propositions d'amélioration de protocoles sont avancées.

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*.

An experiment of genetic selection based on the criterion of survival to Syndrome 93 has been conducted at the Laboratory of Aquaculture of New Caledonia. The 3rd selected generation had demonstrated very encouraging results (survival rates improved by around 20% in experimental infections with *V. penaeicida*). These results have not been confirmed at the 4th generation and no difference in terms of physiology and immunology appears between the selected population and the non-selected control population. The potential causes of these results are examined and proposals for protocol improvements are given.

Mots-clés :

Amélioration génétique, *L. stylirostris*, résistance, Syndrome 93

Keywords :

Genetic improvement, *L. stylirostris*, disease resistance, Syndrome 93

Commentaire :

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
SOMMAIRE	7
1 INTRODUCTION	8
1.1 Contexte socio-technico-économique de la filière aquacole de crevettes pénéides de Nouvelle-Calédonie	8
1.2 Le contexte scientifique	10
1.2.1 Le modèle d'infection expérimentale	11
1.2.2 Le programme de sélection génétique sur critère de survie aux épisodes de mortalité au Syndrome 93	11
2 MATERIELS ET METHODES	14
2.1 Matériel biologique	14
2.1.1 Rappels sur les générations GO à G3 : principe général de sélection sur un critère de survie aux épisodes de Syndrome 93	14
2.1.2 La génération G4	14
2.2 Démarches adoptées pour la comparaison des deux populations	17
2.2.1 Réponse directe à la sélection par évaluation des taux de survie	17
2.2.2 Réponse corrélée à la sélection par comparaison de différents paramètres physio-immunologiques et épidémiologiques	18
2.3 Protocoles expérimentaux et analyses	20
2.3.1 Infections expérimentales	20
2.3.2 Mesure des différents paramètres physio-immunologiques et épidémiologiques étudiés	22
2.3.3 Analyses statistiques	24
3 RESULTATS	25
3.1 Comparaison des survies des deux populations	25
3.1.1 Survies en condition de grossissement	25
3.1.2 Survies aux infections expérimentales	25
3.2 Comparaison des paramètres physio-immunologiques des deux populations	28
3.2.1 Comparaison des poids individuels	28
3.2.2 Comparaison hors période à risque de Syndrome 93 (mars 2004)	28
3.2.3 Comparaison en période à risque du Syndrome 93 et en conditions d'infection expérimentale (avril 2004)	30
3.3 Comparaison des facteurs épidémiologiques	33
3.3.1 Prévalence de <i>V. penaeicida</i>	33
3.3.2 Résultats complémentaires	33
4 DISCUSSION	35
4.1 Des outils de comparaison des deux populations inadaptés ?	37
4.2 Des populations témoins et sélectionnées mal constituées ?	41
5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	46
ANNEXES	49

1 Introduction

1.1 Contexte socio-technico-économique de la filière aquacole de crevettes pénéides de Nouvelle-Calédonie

La production de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie repose uniquement sur l'élevage de *Litopenaeus stylirostris* reproduite en captivité. Originaire d'Amérique Centrale et du Sud, cette espèce a été choisie car sa biologie en captivité permettait de réaliser des élevages tout au long de l'année, y compris durant la saison fraîche. De plus, la domestication (qui peut être définie comme la sélection qui s'opère spontanément pour de meilleures aptitudes à l'élevage) qu'elle a subie progressivement depuis plus de 25 générations a conduit à rendre cette souche résistante au virus IHHN, présent en Nouvelle-Calédonie (Weppe *et al.*, 1992). Les excellentes performances enregistrées par la filière en pleine expansion, à savoir des rendements de l'ordre de 4t/ha/an (Lucien-Brun, 2001) et une production de 1800t/an sont sans doute en partie dues à la domestication de *L. stylirostris*. Ce succès technique induit un chiffre d'affaire d'environ 16 millions d'euros chaque année et 900 emplois principalement en zone rurale.

Grâce à une dynamique particulière liée aux recherches menées en amont par l'IFREMER au Centre Océanologique du Pacifique (Aquacop, 1979 et 1984), aux recherches plus appliquées menées par l'IFREMER à la Station d'Aquaculture de Saint-Vincent en Nouvelle-Calédonie, une première activité d'aquaculture de pénéides en Nouvelle-Calédonie est mise en place en 1980. Les 4 premières fermes de production ont d'abord travaillé selon un mode d'élevage semi-intensif à densité modérée (10-15 ind./m², bassins de près de 10ha de surface) avant de passer à des densités plus élevées (25-30 ind./m², bassins de surface réduite à quelques hectares). En 1990, inspirées par le mode de production en plein essor en Asie, 4 fermes intensives à plus forte densité (27-42 animaux par m²) se sont créées. Aujourd'hui, la pénéculture se développe surtout par de nouvelles fermes d'élevage semi-intensif non-aéré (densité de 17-22 ind./m²). On dénombre sur le territoire une quinzaine de fermes de production soit une surface d'exploitation de 500ha, 3 écloséries et une usine de conditionnement qui exporte plus des trois quarts de la production (Fig. 1). Les perspectives de développement de la filière sont ambitieux puisque les objectifs de production pour 2010 s'élèvent à 5000t/an (sans augmentation du rendement) et que la surface d'exploitation sera alors de plus de 1000ha.

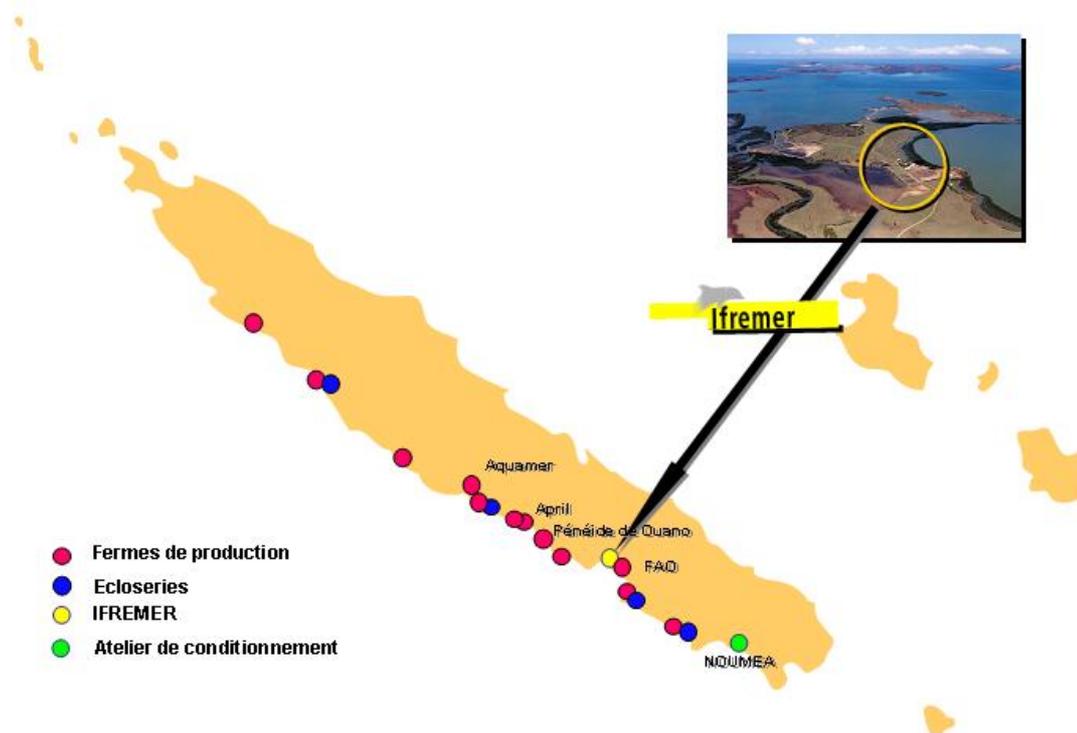


Fig. 1. Carte des implantations des fermes de production, des écloseries, de l’Ifremer et de l’atelier de conditionnement en Nouvelle-Calédonie.

Cependant, la filière doit faire face depuis quelques années à deux pathologies saisonnières : la première, le Syndrome 93 ou Syndrome d’hiver, est apparue en 1993 (Mermoud *et al.*, 1998) et affecte toutes les fermes, tandis que la seconde, le Syndrome d’été, est apparue en 1998 et affecte en 2004 deux fermes (Fig. 2). Bien que le Syndrome d’été et ses risques de propagation soient réellement préoccupants, il avait été convenu par l’ensemble des acteurs de la filière que la priorité devait être accordée à un programme de soutien vis-à-vis du Syndrome 93, qui aujourd’hui, a obligé la plupart des aquaculteurs à ne réaliser qu’un élevage par an, en saison chaude. Cette maladie impose en effet des contraintes fortes à la filière liées à une organisation déséquilibrée durant l’année : les demandes en post-larves aux écloseries de production, pour l’ensemencement des bassins, sont concentrées sur de courtes périodes et l’atelier de conditionnement (SOPAC) doit gérer désormais un engorgement saisonnier.

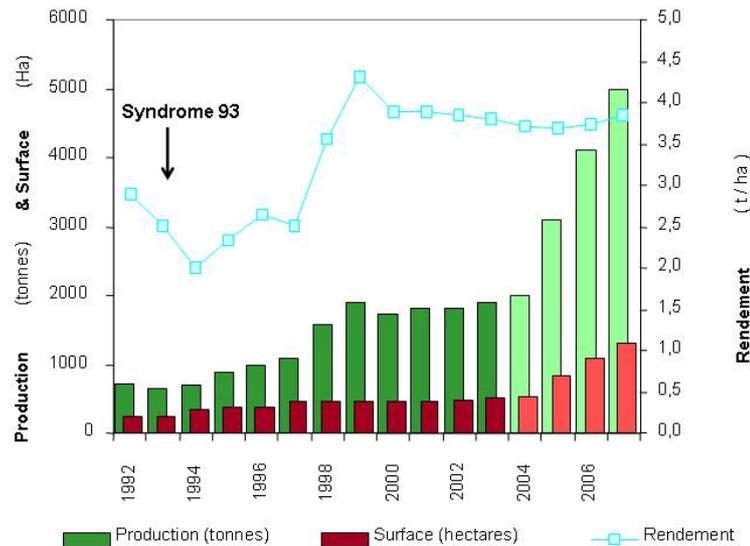


Fig. 2. Surfaces exploitées, productions annuelles et rendements de l'aquaculture crevettes en Nouvelle-Calédonie. (source : données GFA).

1.2 Le contexte scientifique

C'est en 1993 que des premières mortalités anormales sur des juvéniles en phase de grossissement apparaissent dans les bassins de production sous forme de flambées épizootiques, affectant les survies qui chutent de 40-60% à 15-25%. Ces épisodes de mortalités sont observés lors des chutes de température entre avril et juin dans les bassins de grossissement. Aucun symptôme n'étant spécifique *a priori* d'une pathologie particulière connue, des analyses diagnostiques ont porté sur de nombreuses hypothèses. Parmi ceux-ci, des échantillons d'hémolymphes prélevés sur les moribondes ont été analysés, montrant l'implication de *Vibrio penaeicida* et permettant d'avancer l'hypothèse d'un diagnostic, aujourd'hui confirmé (Costa *et al.*, 1998 ; Goarant *et al.*, 1999) d'une vibriose septicémique liée à cette espèce bactérienne.

Les difficultés rencontrées dans la gestion de la crise sont de deux ordres : la première émane de la variabilité de la maladie d'une année sur l'autre, tant sur son intensité que sur le nombre de bassins affectés ; la seconde provient de la complexité des mécanismes en jeu dans les pathologies de type vibrioses dont les causes sous-jacentes peuvent être très diverses : infectieuses, toxiques, nutritionnelles, environnementales... Le suivi régulier de cette pathologie depuis 1993 a cependant permis de mettre l'accent sur le facteur déclenchant ces crises, à savoir la chute de température de l'eau des bassins qui reste l'élément central dans cette pathologie. Cependant, nous savons que ces chutes de température entraînent des modifications de la physiologie et de l'état immunitaire de l'hôte (Lemaire *et al.*, 2002 ; Le Moullac et Haffner, 2000), de la pathogénicité des souches bactériennes en cause (Goarant *et al.*, 2000) et enfin de l'écologie du bassin (Lefèvre *et al.*, 2004). Il

est encore difficile aujourd'hui de cerner le rôle propre de chacun de ces trois compartiments, hôte, pathogène et environnement, et les interactions les reliant.

Enfin, les aquaculteurs souhaitant rétablir la possibilité de réaliser des élevages de saison fraîche, l'IFREMER, conscient de cette demande sociétale, a mis en place un programme de soutien à la filière calédonienne, le programme « DéSanS » ou Défi Santé Stylirostris, dans lequel les problématiques liées au Syndrome 93 et au Syndrome d'été tiennent une place dominante. L'objectif principal est de rechercher des solutions potentielles de gestion de ces pathologies grâce à une meilleure caractérisation des mortalités *in situ* ou lors d'études expérimentales. Cinq thématiques interagissent dans ce programme : pathologie-épidémiologie, immunologie, physiologie, génétique et environnement.

1.2.1 Le modèle d'infection expérimentale

Dans l'étude du Syndrome 93, la mise au point d'un outil d'infection expérimentale a permis d'initier l'étude de cette pathologie en conditions expérimentales contrôlées et de comparer la résistance de différents lots de crevettes à une infection à *V. penaeicida*. Même si le modèle d'infection expérimentale mis au point sur des crevettes naïves à Tahiti a permis de définir une dose létale reproductible pour 50% de crevettes infectées, son application en Nouvelle-Calédonie sur des lots de crevettes pour la plupart porteuses saines (Goarant *et al.*, 2004) n'a pas encore abouti à une standardisation des conditions d'infection. En effet, le stress provoqué par la manipulation et le transfert des crevettes en salle d'infection peut entraîner, en fonction de l'état physiologique des crevettes et des conditions environnementales d'élevage, des mortalités d'intensité variable et non prédictible de type Syndrome 93. Cependant, l'infection expérimentale reste un des outils disponibles pour comparer la résistance à *V. penaeicida* de différents lots de crevettes.

1.2.2 Le programme de sélection génétique sur critère de survie aux épisodes de mortalité au Syndrome 93

- ***Schéma de sélection***

Le programme d'amélioration génétique expérimentale de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie est basé sur une méthode de génétique quantitative qui vise à améliorer la résistance au pathogène responsable des mortalités d'hiver dans les bassins de production, à savoir *V. penaeicida*, par sélection sur un critère de survie aux épisodes de Syndrome 93 dans les conditions d'élevage normales. Mermoud *et al.* (1998) ont montré qu'une forte densité des élevages favorisait l'apparition du Syndrome 93 dans les bassins de production. Or, le protocole en vigueur pour la production des géniteurs est un protocole d'élevage en faible densité afin de leur assurer une

meilleure croissance et d'optimiser leur potentiel de géniteurs. La population de crevettes calédoniennes a donc été peu soumise à une pression de sélection liée au Syndrome 93. C'est ce qui peut expliquer qu'aucune résistance n'a pu être sélectionnée spontanément dans ces conditions. L'expérience menée par le Laboratoire Aquacole de Calédonie depuis 2000 a donc consisté à produire 2 populations à partir de la même base génétique en utilisant comme reproducteurs : d'une part des animaux ayant survécu à des épisodes de mortalité de type Syndrome 93 dans des bassins de production, d'autre part des animaux issus des bassins d'élevage traditionnels de géniteurs à faible densité. Quatre générations « sélectionnées » (population S) ont ainsi été produites, tandis que quatre générations « témoins non sélectionnées » (population T) étaient créées simultanément.

• **Résultats de la 3^{ème} génération**

Les 2 populations ont été caractérisées à la deuxième et à la troisième génération sur le caractère de survie à une infection expérimentale à *V. penaeicida*. De plus, à la troisième génération, le niveau d'expression de quelques gènes d'effecteurs immunitaires (les pénéidines, la transglutaminase, le lysozyme et l'annexine) a été déterminé par évaluation des quantités relatives de transcrits (Goyard *et al.*, 2003a). Ainsi, il a été montré d'une part que le nombre d'individus survivants aux épisodes de mortalité à *V. penaeicida* a été augmenté d'environ 15-20% en trois générations (Goyard *et al.*, 2004.) et d'autre part que la population sélectionnée semble avoir des niveaux d'expression en lysozyme supérieurs à ceux de la population témoin.

• **Intérêt de la confirmation des résultats sur la 4^{ème} génération et objectifs**

Dans ce contexte et compte tenu de la faible longévité d'une génération de crevettes (12-15 mois), il a été décidé de confirmer sur la 4^{ème} génération les capacités de survie accrue de la population sélectionnée, de vérifier si la sélection a affecté, positivement ou négativement, d'autres caractères d'intérêts vitaux pour la filière, enfin d'évaluer des indicateurs susceptibles d'être liés à cette résistance accrue.

L'objectif de ce travail est donc la comparaison des deux populations sélectionnée et témoin en terme de résistance, de physiologie, d'immunologie et d'épidémiologie. Compte tenu de la saisonnalité du Syndrome 93, les démarches adoptées afin de répondre à cette problématique générale sont appliquées hors période à risque, puis en période à risque du Syndrome 93 et sont organisées autour de deux axes de recherche :

- le premier concerne l'évaluation de l'efficacité du schéma de sélection et l'héritabilité de la résistance. La méthode de travail est basée sur la comparaison des survies de 2 populations en condition de grossissement et en condition d'infection expérimentale.

- le second axe de recherche vise à comprendre les mécanismes sous-jacents déployés en situation d'infection. Dans ce contexte où les mortalités type Syndrome 93 sont sous la dépendance de nombreuses variables, la méthode de travail est basée sur la comparaison de différents facteurs immunologiques, physiologiques et épidémiologiques susceptibles d'être corrélés à la sélection et de refléter une meilleure résistance au stress et/ou au *Vibrio*, mesurés sur les 2 populations. Les estimations des prévalences de *V. penaeicida* permettent de déterminer s'il s'agit d'une véritable résistance à l'infection (prévalence plus faible chez les sélectionnés sous-entendant l'existence d'un mécanisme immunitaire d'élimination du pathogène dans l'individu) ou plutôt d'une meilleure tolérance vis-à-vis du pathogène (prévalence équivalente dans les 2 populations).

2 Matériels et Méthodes

2.1 Matériel biologique



Fig. 3. Vue aérienne de la station LAC.

2.1.1 Rappels sur les générations G0 à G3 : principe général de sélection sur un critère de survie aux épisodes de Syndrome 93

La population fondatrice G0 a été obtenue durant l'année 2000. Les générations suivantes de la population témoin ont été obtenues à partir de témoins élevés à faible densité ; les générations suivantes de la population sélectionnée ont été obtenues à partir d'animaux élevés à forte densité et dans des conditions environnementales telles que le Syndrome 93 est apparu à chaque génération. Les quatre générations de la population sélectionnée ont donc été soumises chacune à une pression de sélection non contrôlée, mais d'intensité variable et difficile à évaluer avec précision (Annexe 1).

De la génération G0 à la génération G3, les populations témoins et sélectionnées ont été reproduites avec des effectifs génétiques d'au moins 13 mâles et 13 femelles chacune.

2.1.2 La génération G4

- *Principe général de gestion et marquage*

La génération G4 a été produite fin 2003 - début 2004 suivant le même principe que les générations précédentes (Annexe 1). La G4 sélectionnée est produite à partir de 15 familles. La G4 témoin est produite à partir de 11 familles. Toutefois, seulement 5 familles témoins ont pu être testées dans le cadre de ce travail, pour des questions d'effectifs disponibles en élevage larvaire. Après un élevage larvaire en éclosérie et un passage en nurserie dans des conditions

environnementales contrôlées, les 2 populations ont été transférées chacune dans un bassin de terre différent durant leur phase de prégrossissement jusqu'à 1,7 gramme de poids moyen. Ce poids est suffisant pour réaliser le marquage, effectué par injection de silicone coloré dans le dernier segment abdominal en position dorsale de la crevette, et traduisant l'appartenance des individus à l'une ou l'autre des deux populations (Godin *et al.*, 1995). Ce marquage permet d'élever les animaux de populations différentes dans un environnement commun et donc de minimiser la part environnementale de la variabilité phénotypique observable. Cette démarche expérimentale fait directement référence à l'équation conceptuelle :

$$P = G + E + GxE$$

où P est le phénotype, l'ensemble des performances mesurables de l'individu ;
 G est le génotype, l'ensemble des gènes de l'individu ;
 E est l'ensemble des paramètres environnementaux dans lequel l'individu se construit et évolue depuis sa naissance ;
 GxE représente les interactions entre G et E.

Les opérations de marquage ont été organisées en fonction des impératifs suivants :

- minimiser, répartir et moyenner les biais (effets « moment de pêche » et « manipulateur » pouvant induire stress et mortalité ...) sur l'ensemble des bassins ;
- ajuster le nombre de crevettes à marquer en fonction des besoins ;
- limiter les risques d'erreurs de transferts.

• ***Gestion zootechnique des bassins de grossissement et objectifs expérimentaux associés***

Tableau 1. Constitution des bassins de grossissement expérimentaux après marquage.

Bassins	Effectifs par bassin (nbre d'ind.)		Densité (nbre d'ind./m ²)	Objectifs
	Population témoin « T »	Population sélectionnée « S »		
B2	5000	5000	20	Réserve de crevettes témoins et sélectionnées pour expérimentations ex situ.
A1	2000	8000	20	1) comparer les survies des populations témoins et sélectionnées au Syndrome 93 ; 2) obtenir au delà du stage les futurs géniteurs sélectionnés pour la G5.
A2	2000	8000	20	

Au total, 5 bassins de grossissement ont étéensemencés dans le courant du mois de février de la façon suivante :

- 2800 individus appartenant aux 11 familles de la population témoin sont répartis dans 2 bassins à faible densité, afin de produire les futurs géniteurs témoin de la génération G5. Ces deux bassins, utiles au programme sur le long terme ne concernent pas directement le sujet du présent rapport et ne seront pas suivis dans le cadre du DEA.

Tableau 2. Les différentes infections expérimentales réalisées et leurs modalités.

Référence de l'infection	Modalité d'infection	Date	Durée du suivi (h)	Nombre total de crevettes transférées	Nombre de bacs	Nombre de crevettes par bac		Nombre de crevettes infectées		Nombre de crevettes NON infectées		Doses d'infection (UFC/mL ou UFC/crevette)		
						Population Sélectionnée	Population Témoin	Population Sélectionnée	Population Témoin	Population Sélectionnée	Population Témoin	Faible	Moyenne	Forte
1	Balnéation (2h dans 100L)	23 mars 2004	72h	320	16	10	10	120	120	40	40	1,00E+04	2,00E+04	5,00E+04
2	Balnéation (2h dans 100L)	6 avril 2004	72h	320	16	10	10	120	120	40	40	1,86E+04	6,65E+04	9,30E+04
3	Balnéation après stabulation de 7 jours	28 avril 2004	98h	326	12	13-14	13-14	162	164	0	0	3,00E+04	3,00E+04	3,00E+04
4	Injection après stabulation de 7 jours	23 mars 2004	78h	320	16	10	10	120	120	40	40	45	450	900
5	Injection après balnéation	30 mars 2004	72h	320	16	10	10	120	120	40	40	15,5	155	310
6	Injection	6 avril 2004	72h	320	16	10	10	120	120	40	40	60	600	1200
7	Injection après balnéation	13 avril 2004	74h	320	16	10	10	120	120	40	40	75	750	1500

- 30 000 individus des 2 populations témoin et sélectionnée sont marqués et répartis dans 3 bassins de terre à forte densité qui favorise l'apparition du Syndrome 93 et destinés à 3 objectifs concernant directement le stage (Tableau 1).

Les crevettes nouvellement transférées dans le bassin B2 de grossissement resteront plus de trois semaines avant les premières expérimentations, cette durée étant considérée comme suffisante pour l'acclimatation des crevettes à leur nouvel environnement (Goyard, com. pers.). Par la suite, le bassin B2 est géré selon un schéma classique de bassin de production dont les principales caractéristiques sont une densité de 20 ind./m², un type d'élevage semi intensif non aéré et des taux de nutrition dégressifs en fonction du poids moyen des individus et de la saison, variant de 0,05 à 0,03 (Taux de nutrition = Quantité d'aliment distribué quotidiennement/ Biomasse théorique).

Le suivi de la croissance est réalisé tous les 15 jours en pêchant et pesant un échantillon de 50 à 100 individus afin d'affiner les rations alimentaires en fonction des croissances observées et du taux de nutrition théorique.

2.2 Démarches adoptées pour la comparaison des deux populations

Intégrée à ces démarches, deux types d'analyses ont été mis en place :

- une analyse immédiate des animaux en sortie de bassin ;
- une analyse des animaux après transfert en milieu contrôlé dans la salle d'infection expérimentale.

2.2.1 Réponse directe à la sélection par évaluation des taux de survie

- ***Comparaison des survies aux épisodes de mortalité du Syndrome 93 en condition de grossissement***

La comparaison des survies des deux populations aux épisodes de Syndrome 93 de l'année 2004 est réalisée sur les données des bassins de terre A1 et A2. Les individus sélectionnés et témoins sont dénombrés lors de la pêche finale réalisée en juin après l'observation des mortalités de type Syndrome 93. Les survies finales des 2 populations sont ainsi estimées à partir des effectifs initiaux connus.

- ***Comparaison des survies aux infections expérimentales à *Vibrio penaeicida****

Le potentiel de survie des deux populations vis-à-vis d'une infection par *V. penaeicida* est également testé en condition expérimentale. Ces différents types d'expérimentations (Tableau 2)

permettent de comparer la résistance de deux populations dans des conditions plus standardisées et contrôlées que celles obtenues dans le milieu naturel des bassins de production.

Les crevettes de Nouvelle-Calédonie n'étant pas naïves compte tenu de l'omniprésence de *Vibrio penaeicida*, l'application stricte du protocole mis au point à Tahiti sur des populations naïves (Saulnier *et al*, 2004) a posé de grosses difficultés en Nouvelle-Calédonie les années précédentes : la DL50 théorique pour la baignade peut induire des taux de mortalité variant de 0% à 100% selon les expériences (Goarant, com. pers). En l'absence de bons critères prédictifs de la réponse à l'infection expérimentale, il a été jugé utile d'utiliser deux modalités d'exposition au pathogène différentes :

- la **baïgnade** utilise une voie d'infection respectant l'intégrité de l'animal puisqu'elle repose sur l'immersion des crevettes dans une suspension bactérienne de *V. penaeicida* pendant 2 heures.
- l'**injection** intramusculaire à la seringue d'une suspension bactérienne de *V. penaeicida* entre les 2^{ème} et 3^{ème} segments abdominaux ne respecte pas les voies biologiques d'infection mais permet à coup sûr d'obtenir une mortalité significative (Goarant, com. pers).

2.2.2 Réponse corrélée à la sélection par comparaison de différents paramètres physio-immunologiques et épidémiologiques

Compte tenu de la saisonnalité du Syndrome 93, deux approches sont développées pour comparer les populations témoin et sélectionnée sur des caractères immunologique, physiologiques et épidémiologiques : la première approche est la comparaison des populations hors période à risque de Syndrome 93 alors que la seconde approche est une comparaison en période à risque de Syndrome 93.

Il a été montré que la mue modifie profondément la physiologie de la crevette et correspond à une phase où l'animal tend à être plus sensible à son environnement (Liu *et al.*, 2004). Les crevettes subissent en fait un cycle de mue composé de 4 étapes principales : la mue (stade A), la postmue (B), l'intermue (C) et la prémue (stades D₀, D₁ et D₂) qui peuvent être déterminés par l'observation du développement de l'épithélium sous-cuticulaire. Aussi, il a été montré chez *L. stylirostris* que les crevettes en stade D₂ de prémue sont plus sensibles à un stress (Mugnier et Soyez, 2001 ; Mugnier et Justou, in Press) ou à une infection expérimentale à *V. penaeicida* que les animaux en stade C, stade d'intermue présentant le moins de variabilité interindividuelle. Ainsi, dans l'hypothèse que des différences existant entre les 2 populations ne puissent être décelables qu'à l'un de ces 2 stades, le choix a été fait de cibler ce travail sur l'étude d'animaux de stade C et de stade D₂.

- ***Hors période à risque du Syndrome 93 (mars 2004)***

Dans le but de caractériser l'état physiologique, immunologique et épidémiologique « basal » des 2 populations hors période à risque de Syndrome 93, une expérimentation plurifactorielle a été effectuée.

Une série de 60 prélèvements individuels d'hémolymphe (30 témoins et 30 sélectionnés) a été réalisée sur des animaux en stade D₂ de prémue en mars 2004. La même opération a été réalisée 2 jours plus tard sur des animaux en stade C d'intermue (Tableau 3).

Ces prélèvements d'hémolymphe sont destinés, pour les uns, aux mesures des indicateurs physio-immunologiques cités dans le tableau 2, et pour les autres, à l'estimation des prévalences de *Vibrio penaeicida*.

- ***En période à risque du Syndrome 93 (avril 2004)***

L'hypothèse d'une interaction « génotype x environnement » pourrait induire le fait que des différences existant entre les deux populations soumises à une infection *V. penaeicida* ne seraient décelables que lorsque les conditions d'expression du Syndrome 93 sont observées. Deux expérimentations, indépendantes pour des raisons logistiques et humaines, ont alors été réalisées pour l'étude des 2 populations en période à risque du Syndrome 93 :

- Afin de comparer la réponse physiologique et immunologique (i) après transfert des animaux en salle d'infection, (ii) avant et (iii) après une infection expérimentale, 3 séries T1, T2 et T3 de 64 prélèvements d'hémolymphe ont été réalisées sur individus en stade C, stade le plus fréquent le premier jour de prélèvement (T1) (Tableau 3). L'infection par balnéation est ici considérée comme un facteur susceptible d'induire une variation différente des paramètres physiologiques et immunologiques chez les témoins et les sélectionnés.
- Afin d'estimer les prévalences de *V. penaeicida* en condition de grossissement, une série de prélèvements d'hémolymphe est effectuée le 25 mai 2004 sur 30 individus de stade D2 au sein de chaque population.

Tableau 3. Paramètres mesurés pour la comparaison des populations d'un point de vue physio-immunologique et épidémiologique en fonction de la période.

Comparaison des 2 populations en terme de physiologie et immunologie et épidémiologie					
Période	HORS période à risque du Syndrome 93 (mars 2004)		EN période à risque du Syndrome 93 (avril 2004)		
Date	24-mars-04	26-mars-04	23-avr-04	27-avr-04	29-avr-04
Principe	Prélèvement d'hémolymphe sur individus pêchés dans bassin B2		Prélèvement d'hémolymphe sur individus préalablement pêchés dans le B2 et transférés en salle d'infection expérimentale :		
Séries			T1: 1 jour après le transfert	T2: 24h avant l'infection et 5 jours après le transfert	T3: 24h après l'infection et 7 jours après le transfert
Nombre d'individus	60	60	64	64	59
Stade de mue	D2	C	C	C	C
Données et paramètres mesurés individuellement	heures de la pêche et de la ponction sexe poids (g) stade de mue population T ou S				
Paramètres physio-immunologiques:	hémocytes totaux (nbre d'hémocytes pas mL d'hémolymphe) THC capacité osmorégulatrice [hémocyanine] (mmol/L) [protéines totales] (mg/mL) [magnésium] (mmol/L) [calcium] (mmol/L) [glucose] (mg/dL) [lactate] (mg/dL)				
Paramètres épidémiologiques	prévalences de <i>V. penaeicida</i>		/		

2.3 Protocoles expérimentaux et analyses

2.3.1 Infections expérimentales

- *Transfert des animaux en salles d'infection expérimentale*

Les 2 salles d'infection expérimentale du LAC contiennent chacune 16 bacs en fibre de verre de 300 litres (Fig. 4). Le réseau de circulation de l'eau de mer permet le renouvellement de l'eau des bacs et la gestion des débits. Après infection, les effluents sont orientés vers des cuves extérieures de 10 000L, dont le contenu est traité par de l'hypochlorite de calcium avant renvoi de l'eau vers le milieu extérieur.



Fig. 4. Photo de la salle d'infection expérimentale.

Pour chaque infection expérimentale, des animaux pêchés à l'épervier dans le bassin B2 représentatifs des 2 populations témoin et sélectionnée, sont transférés dans les salles expérimentales et répartis à raison de 10 individus sélectionnés et 10 individus témoins par bac.

- ***Les modes d'infections***

Les deux modalités d'infection, baignation ou injection, sont appliquées, selon les expériences soit immédiatement après le transfert soit après une période de 7 jours d'acclimatation dans la salle d'infection. De plus, des lots préalablement infectés par baignation et ayant survécu à 100% ont été ré-infectés par injection 7 jours après la baignation (Tableau 2).

Après les deux heures de baignation dans une suspension de bactéries, les bacs sont vidés et remplis avec 200L d'eau de mer filtrée. Après les infections, l'eau des bacs n'est plus renouvelée. Les mortalités dues aux manipulations de transfert et de marquage sont relevées dans les 12 heures suivant l'infection et déduites des effectifs initiaux. Les animaux sont nourris *ad libitum*. Le suivi des mortalités et le relevé des couleurs des marques de silicone des animaux morts post-infection sont effectués 3 à 5 fois par jour durant 51 à 98 heures. Les animaux survivants des deux populations sont dénombrés lors du bilan réalisé au terme du suivi de l'infection.

- ***Souche de *V. penaeicida* utilisée et doses infectantes***

La souche bactérienne utilisée est la souche AM101, dont la forte pathogénicité a été testée à Tahiti (Saulnier *et al.*, 2004). Elle est décongelée à partir du stock conservé à -80°C depuis début 1997, puis cultivée dans des conditions strictes de cultures *in vitro* : milieu ZoBell ou Marine Broth (Annexe 2) sous agitation permanente à 27°C . La concentration des cultures est estimée à partir de la relation linéaire trouvée entre la concentration bactérienne et la densité optique obtenue après lecture au spectrophotomètre à 600 nm (Goarant *et al.*, données non publiées) (Annexe 3). Cette concentration estimée sert de base au calcul nécessaire à la préparation par dilution des différentes

doses infectantes à tester à chaque expérience. Une vérification de ces concentrations est réalisée *a posteriori* par étalement sur gélose nutritive des suspensions bactériennes utilisées pour l'infection, et comptage des colonies après une nuit d'incubation à 27°C.

Pour chaque expérience d'infection 3 doses infectantes sont testées (sauf infection n°3, Tableau 2) : 4 lots (correspondant à 4 bacs de 10 témoins et 10 sélectionnés) sont soumis à une **faible** dose infectante, 4 autres à une dose **moyenne** et 4 autres à une **forte** dose. Les 4 bacs restant constituent les bacs contrôle de l'infection. Dans le cas de l'infection par injection, les crevettes de ce lot reçoivent une injection de même volume d'eau de mer stérile. Les doses infectantes testées lors des infections par balnéation varient de $1,0 \cdot 10^4$ à $9,3 \cdot 10^4$ UFC/mL (UFC = Unité Formant Colonie). Les doses infectantes testées lors des infections par injection varient de 15,5 à 1500 UFC/crevette.

Remarque : Il convient de préciser la définition de l'expression bac « contrôle » de l'infection : ces bacs « contrôle » désignent les bacs non infectés qui servent de « contrôles d'infection ». Dans un souci de clarté et afin de ne pas commettre d'amalgame avec le terme « témoin », qui qualifie déjà dans ce rapport la population comparée à la population sélectionnée, il a été jugé préférable d'employer le mot « contrôle » dans ce cas.

2.3.2 Mesure des différents paramètres physio-immunologiques et épidémiologiques étudiés

• Paramètres physio-immunologiques

La détermination du stade de mue de chaque crevette est faite par l'observation de l'écaille antennaire et/ou d'un uropode sous une loupe binoculaire, selon la description de Drach et Tchernigovtzeff (1967). Les crevettes sont ensuite sexées et pesées individuellement au dixième de gramme.

La ponction d'hémolymphe est réalisée au niveau du sinus ventral à l'aide d'une seringue hypodermique de 1mL.

La pression osmotique d'un échantillon de 10 μ L est mesurée directement dans un osmomètre tout comme la pression osmotique de l'eau des bacs. La capacité osmorégulatrice CO est calculée en faisant la différence entre la pression osmotique de l'eau de mer et celle de l'hémolymphe.

Le dosage de l'hémocyanine est également réalisé au moment du prélèvement sur 10 μ L d'hémolymphe dilués dans de l'eau distillée par lecture, à une dilution appropriée (1/40) de la densité optique (DO) au spectrophotomètre (Spectronic Genesys 5) à 335nm contre de l'eau distillée.

En prévision du comptage des hématocytes totaux, 10 μ L d'hémolymphe sont placés dans de l'Alsever formolé, alors que 50 à 150 μ L d'hémolymphe sont placés dans du citrate de sodium 10% en prévision des dosages des protéines totales, magnésium, calcium, glucose et lactate.

Dans l'heure suivant le prélèvement, l'hémolymphe conservée sur glace dans l'anticoagulant est centrifugée à 700g à 5°C pendant 5 minutes. Les plasmas sont stockés à -80°C dans l'attente des dosages. Les animaux manipulés sont ensuite sacrifiés.

Le comptage des hémocytes totaux est réalisé dans une cellule de Malassez à l'aide d'un microscope Leica DMLB à contraste de phase.

Les dosages du magnésium, du calcium, du glucose et du lactate sont réalisés par microtitrations à l'aide de kits Biomérieux adaptés à la microplaque sur les échantillons de plasma conservé à -80°C. Les protéines totales sont également dosées en microplaque contre une gamme BSA selon la méthode de Folin. Les absorbances sont lues au lecteur microplaque DigiWin. Les dosages du glucose et du lactate sont réalisés après déprotéinisation du plasma. Les méthodes adoptées pour les mesures de ces indicateurs sont détaillées en annexe 4.

- ***Estimation des prévalences dans les populations de *Vibrio penaeicida****

- Test diagnostique

Le test diagnostique utilisé afin d'obtenir une estimation de la prévalence de ce pathogène est la technique de PCR, Polymerase Chain Reaction appliquée au moyen d'amorces spécifiques sur les échantillons d'ADN extraits des prélèvements effectués (Annexe 5). Les résultats obtenus sont qualitatifs : les individus testés sont qualifiés de porteurs -« positifs »- ou non-porteurs -« négatifs ».

- Extraction d'ADN

La technique d'extraction d'ADN au Chélex (Saulnier *et al.*, 2000 ; Goarant *et al.*, 2004) est employée sur les échantillons à traiter (Annexe 6). Toutefois, des essais complémentaires ont été effectués à l'aide de deux autres techniques :

- Une extraction au phénol chloroforme (Annexe 7) est réalisée sur 5 échantillons du 25 mai 2004.
- Une purification de l'ADN contenu dans les extraits au Chélex est réalisée à l'aide d'un kit commercial Roche sur 5 échantillons du 25 mai 2004.

- Migration et méthode d'analyse des prévalences

Les amplicons sont visualisés sous UV par révélation au bromure d'éthidium après électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5%. Un témoin positif et un témoin négatif permettent de valider l'amplification et la non contamination des échantillons.

2.3.3 Analyses statistiques

Les différences d'effectifs de survivants aux infections entre les 2 populations témoin et sélectionnée ont été analysées par un test du Khi^2 à un seuil de significativité de 5% sous le logiciel StatView5.0.

La comparaison des indicateurs mesurés pour les 2 populations en fonction de l'expérimentation et/ou d'autres paramètres (sexe, poids, temps post-pêche) a été analysée par des ANOVA (seuil de significativité de 5%) à un ou deux facteurs associées au test *a posteriori* PLSD de Fisher lorsqu'une différence significative était observée.

Les prévalences sont analysées par un test du Khi^2 .

3 Résultats

3.1 Comparaison des survies des deux populations

3.1.1 Survies en condition de grossissement

Tableau 4. Survies finales obtenues après épisodes de Syndrome 93 dans les bassins de terre.

	Bassin A1		Bassin A2		A1 + A2	
	T	S	T	S	T	S
Eff. initiaux	2000	8000	2000	8000	4000	16000
Eff. survivants	699	2771	814	2900	1513	5671
Taux de survie	35%	35%	41%	36%	38%	35%
p(Khi ²)	>0,05		0,0003		0,0054	

Suite aux épisodes de Syndrome 93, les survies finales des 2 populations obtenues dans le bassin A1 ne sont pas significativement différentes alors que celles obtenues dans le bassin A2 rendent compte d'une différence significative entre les 2 populations témoin et sélectionnée avec un taux de survie de la population témoin (41%) supérieur à celui de la population sélectionnée (36%) (Tableau 4).

3.1.2 Survies aux infections expérimentales

Sur l'ensemble des expériences d'infection, les taux de survies des bacs de contrôle d'infection sont compris entre 98% et 100%.

- *Survies aux baignades*

Tableau 5. Survies observées lors des 3 infections par baignade.

Référence baignade	Nbre d'ind. infectés		Nbre d'ind. morts		Taux de survie		Khi ²	p(Khi ²)
	T	S	T	S	T	S		
1	120	120	0	0	100%	100%		
2	120	120	4	5	97%	96%	0,115	0,73
3	162	164	62	50	61%	70%	2,201	0,07

Les survies des 3 infections expérimentales réalisées par baignade (Tableau 2) sont données dans le tableau 5. Lors des deux premières expériences, les survies des lots infectés toutes doses confondues ne sont pas significativement différentes des lots de contrôles non infectés. Pour la baignade n°3, le test du Khi² ne révèle pas de différence significative entre les populations témoin et sélectionnée (p=0,07).

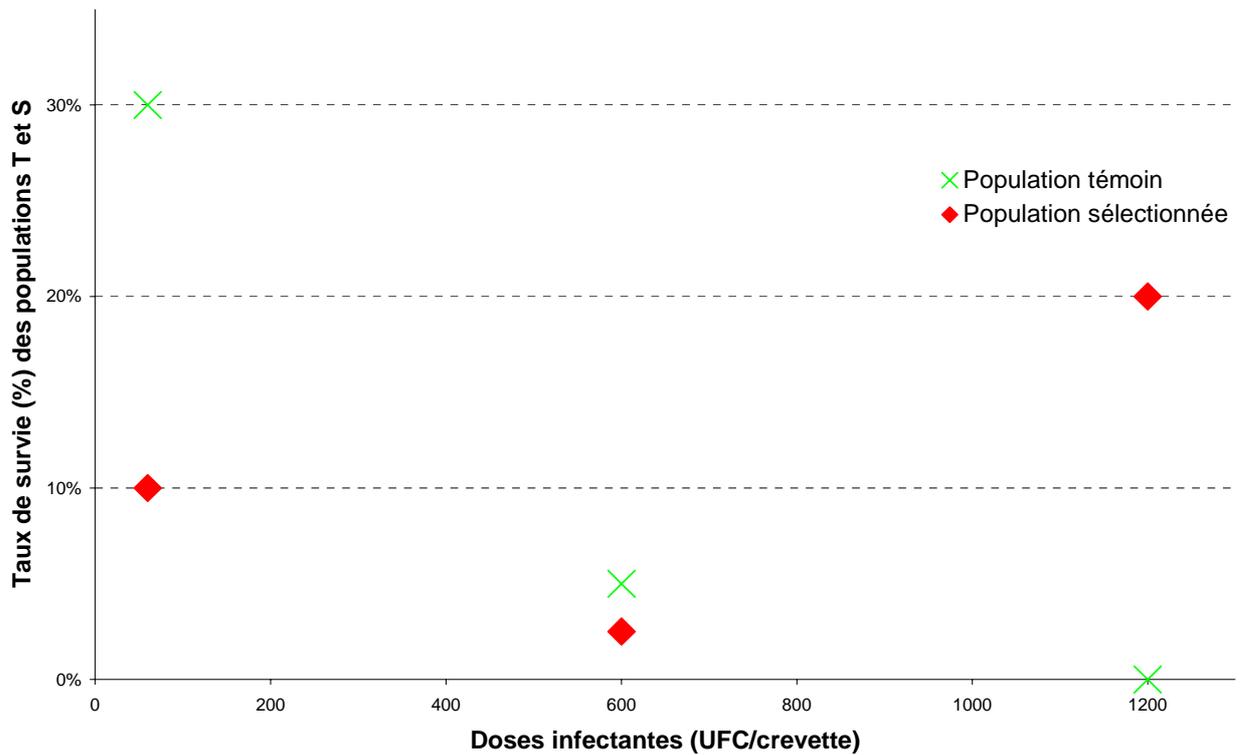


Fig.5. Taux de survie obtenus après l'infection n°6 en fonction de la dose infectante.

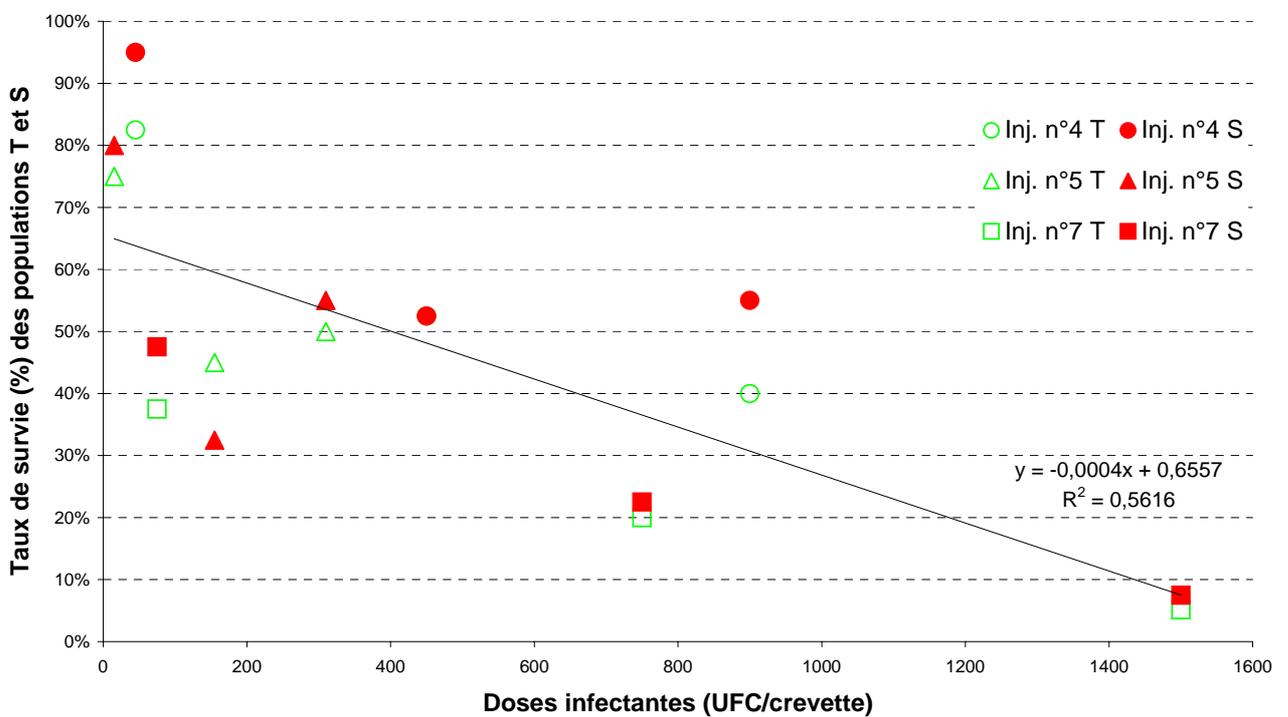


Fig. 6. Les taux de survie des infections expérimentales n°4, 5 et 7 en fonction des doses infectantes.

- *Survies aux injections*

Les cinétiques de mortalité obtenues pour les 4 infections par injection sont données en annexe 8. Les taux de survie finale des lots témoins et sélectionnés obtenues après l'infection par injection n°6, pratiquée sans période d'acclimatation, sont respectivement de 12% et 11% toutes doses confondues. La survie finale n'est pas une fonction croissante de la dose infectante dans ces conditions (Fig. 5).

Les survies moyennes à l'issue des autres infections par injection (Fig. 6), toutes doses confondues, sont de 68% pour les lots témoins et de 75% pour les lots sélectionnés. Sur les 9 doses testées au total, on n'observe que deux cas pour lesquels la survie des témoins est supérieure ou égale à celle des sélectionnés (respectivement doses de 155 UFC/crevette et de 450 UFC/crevette). Les 7 autres cas aboutissent à des taux de survie des lots sélectionnés supérieurs à ceux des lots témoins. Cependant, pour aucune de ces trois expériences prises indépendamment des autres, les différences de survies ne sont significatives (Tableau 6).

Tableau 6. Résultats des test du Khi² réalisés sur les effectifs de survie de 2 populations après les injections.

Référence injection	Nbre d'ind. infectés		Nbre d'ind. morts		Taux de survie		Khi ²	p(Khi ²)
	T	S	T	S	T	S		
4	120	120	50	39	58%	68%	2,161	14%
5	120	120	52	53	57%	56%	0,017	90%
7	120	120	94	89	21%	26%	0,779	38%
<i>Total</i>	<i>360</i>	<i>360</i>	<i>196</i>	<i>181</i>	<i>68%</i>	<i>75%</i>	<i>0,186</i>	<i>67%</i>

Globalement, toutes populations et expériences confondues, la survie décroît de façon significative quand les concentrations injectées augmentent (test par régression linéaire, p<0,0001).

- *Synthèse*

Tableau 7. Résultats du test du Khi² sur les effectifs de survie aux 7 infections expérimentales toutes modalités confondues.

	Nbre d'ind. infectés		Nbre d'ind. morts		Taux de survie		Khi ²	p(Khi ²)
Synthèse Infections	T	S	T	S	T	S		
	884	882	371	341	58%	61%	2,006	16%

Les résultats de survie observés sur l'ensemble des 7 infections expérimentales, toutes modalités d'infection et doses infectantes confondues sont rassemblés dans le tableau 7. Les taux de survies de chaque population sur l'ensemble des 7 infections expérimentales ne sont pas significativement différents (p=0,16).

3.2 Comparaison des paramètres physio-immunologiques des deux populations

3.2.1 Comparaison des poids individuels

Tableau 8. Comparaison des poids moyens des populations témoin et sélectionnée.

	Mars 2004		Avril 2004	
	N	Poids moyens (g)	N	Poids moyens (g)
Témoin	60	4,509 ± 0,991	89	7,476 ± 1,024
Sélectionnée	60	4,271 ± 1,077	98	6,951 ± 1,463
Valeur de p	0,21		0,0054	

Aucune différence significative des poids individuels n'est mise en évidence entre les 2 populations testées sur les échantillons de mars 2004 alors que fin avril 2004, la population témoin présente un poids moyen significativement supérieur de 7% à celui de la population sélectionnée (Tableau 8). L'effet « poids » sera donc analysé sur les paramètres physio-immunologiques mesurés.

3.2.2 Comparaison hors période à risque de Syndrome 93 (mars 2004)

- *Effet des facteurs étudiés sur les 8 indicateurs physiologiques et immunologiques mesurés*

- Effet « stade de mue »

Les deux séries de prélèvements, décalées dans le temps pour des raisons logistiques, correspondent aux 2 stades de mue C et D₂ : le potentiel effet « stade de mue » n'est ainsi pas mesurable mais il est pris en compte en traitant les 2 séries de prélèvements de façon indépendante.

- Effet « sexe »

L'ANOVA ne révèle d'effet « sexe » sur aucun des 8 indicateurs physiologiques et immunologiques évalués fin mars 2004. Les résultats sont donc traités sans distinction du sexe.

- Effet « temps post-pêche »

Le temps post-pêche constituant un facteur influençant certains paramètres physiologiques (Mugnier, com. pers.), son effet a été analysé. Durant cette expérimentation, il a été difficile pour des raisons techniques de réduire le temps post-pêche à quelques minutes. Il varie donc de 1 minute à 52 minutes avec une moyenne de 20 minutes sur les 120 individus traités. Les régressions réalisées ne mettent en évidence aucun effet significatif ($p > 0,05$) de ce paramètre sur les variations des indicateurs physiologiques analysées tous stades confondus. En revanche, une analyse séparée des indicateurs pour chacun des stades C et D₂ révèle l'influence significative du « temps post-pêche » sur deux indicateurs :

- La capacité osmoréglutrice CO des individus du stade D₂ diminue de façon significative ($p = 0,0033$) avec le temps post-pêche ;

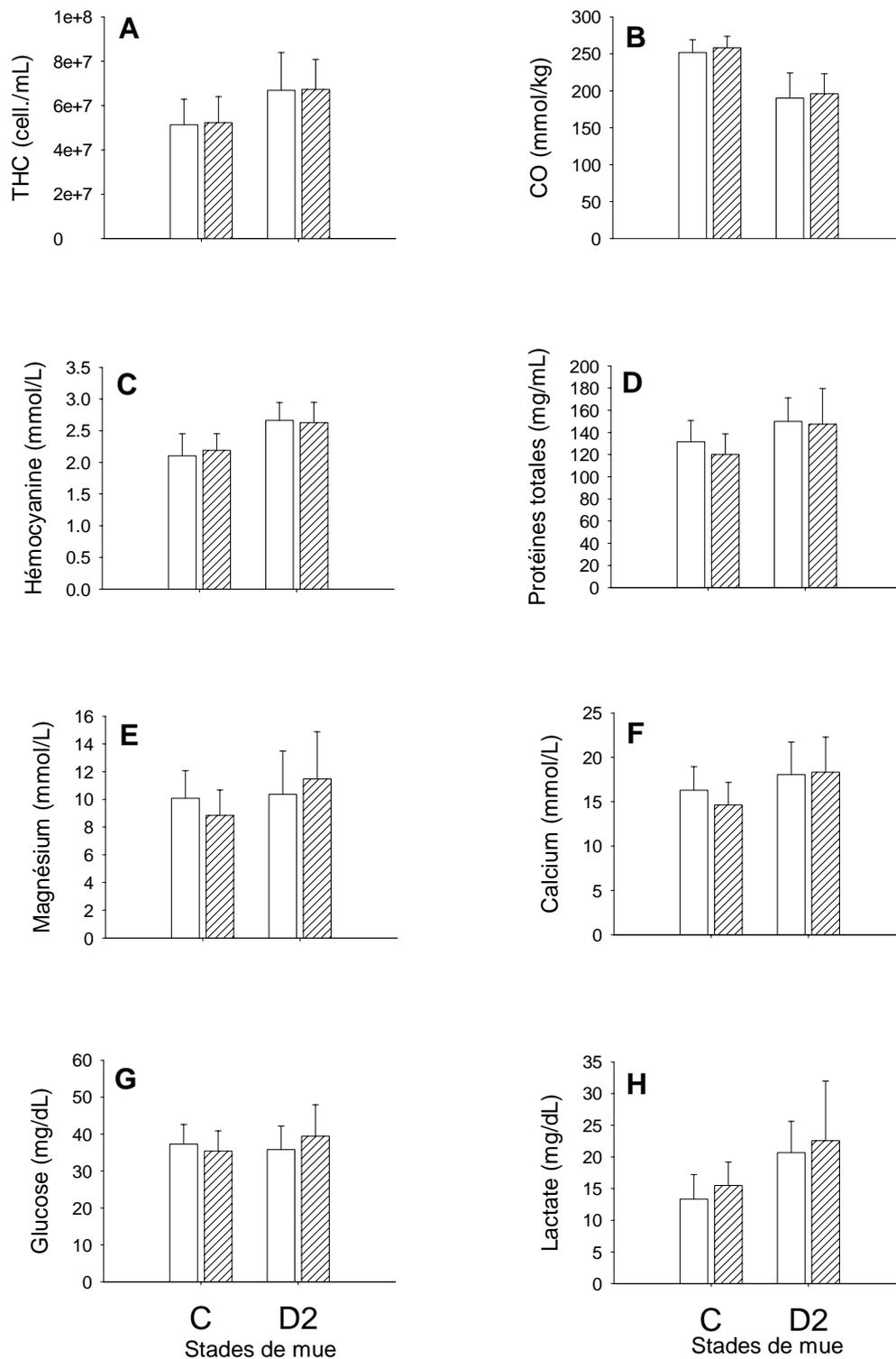


Fig. 7. Moyennes (\pm ES) des hémocytes totaux (A), de la capacité osmorégulatrice (B) et des concentrations d'hémocyanine (C), de protéines totales corrigée de l'effet poids (D), de magnésium corrigée de l'effet poids (E), de calcium corrigée de l'effet poids (F), glucose (G) et lactate (H) dans l'hémolymphe d'animaux témoins (barres blanches) et sélectionnés (barres rayées) aux stades de mue C (26 mars 2004) et D2 (24 mars 2004) hors période à risque de Syndrome 93 (mars 2004). Pas de différence significative entre les individus témoins et sélectionnés (ANOVA, $p > 0,05$).

- La concentration en glucose dans l'hémolymphe des individus du stade C augmente de façon significative (p=0,0154) avec le temps post-pêche.

Cependant, une ANOVA montre qu'il n'y a pas de différence significative du facteur temps post-pêche entre les 2 populations témoin et sélectionnée (les prélèvements d'hémolymphe n'ont pas été réalisés population par population). Les valeurs de glucose des individus en stade C et de capacité osmorégulatrice des individus en stade D₂ n'ont donc pas été corrigées.

- Effet « poids individuel »

L'effet « poids » est testé par régression linéaire sur chacun des paramètres physiologiques et immunologiques étudiés. Les résultats de ces régressions montrent une influence significative du poids sur 3 paramètres physiologiques : les concentrations en protéines totales [prot] (p=0,0012), en magnésium [Mg] (p=0,0363) et en calcium [Ca] (p=0,0095). Une correction des indicateurs physiologiques [Mg], [Ca] et [prot] mesurés est effectuée à partir de l'équation de la courbe de régression obtenue selon la formule suivante :

$$y_{corr} = y_{moy} + (y_{réel} - y_{théor})$$

avec $y_{théor} = aP + b$ où P représente le poids individuel.

- **Analyse de l'effet « population »**

Les moyennes et écarts types de 8 paramètres physio-immunologiques, le cas échéant corrigés des effets indiqués plus haut, sont calculés pour chaque stade, C et D₂, et pour chaque population, T et S (Fig. 7). L'effet « population » sur les moyennes de ces paramètres révèle qu'aucun de 8 indicateurs physio-immunologiques mesurés n'est différent de façon significative entre les populations hors période à risque du Syndrome 93.

3.2.3 Comparaison en période à risque du Syndrome 93 et en conditions d'infection expérimentale (avril 2004)

- **Effet des facteurs sexe et poids sur les paramètres physiologiques et immunologique étudiés**

Les temps post-pêche sont tous inférieurs à 10 minutes, temps en dessous duquel il n'y a pas d'effet observé sur les indicateurs physiologiques (Mugnier et Justou, 2003). Seuls les effets sexe et poids sont analysés :

- Aucun effet « sexe » n'est observé.
- Un effet « poids » est observé sur les 3 paramètres suivants CO (p=0,0079), [hémoc] (p=0,0323) et [Mg] (p=0,0385), une correction à partir des équations des droites de régression est effectuée sur les valeurs de ces paramètres avant leur analyse par ANOVA.

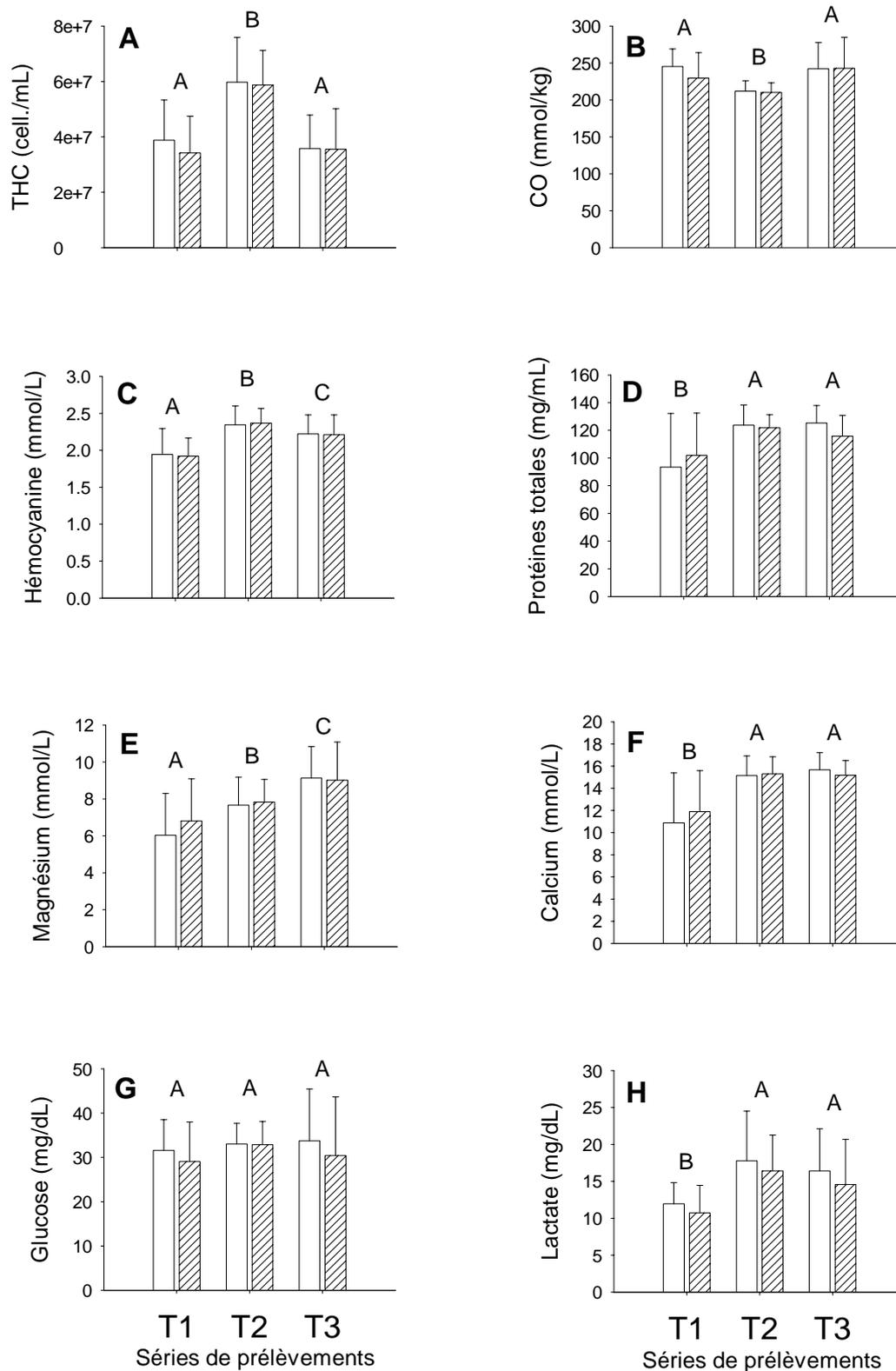


Fig. 8. Moyennes (\pm ES) des hémocytes totaux (A), de la capacité osmoréglatrice corrigée de l'effet poids (B) et des concentrations d'hémocyanine corrigée de l'effet poids (C), de protéines totales (D), de magnésium corrigée de l'effet poids (E), de calcium (F), glucose (G) et lactate (H) dans l'hémolymphe d'animaux de stade C témoins (barres blanches) et sélectionnés (barres rayées) des séries de prélèvements T1 (24h après transfert), T2 (24h avant infection) et T3 (24h après infection) (avril 2004). Les différences significatives (ANOVA, $p < 0,001$) entre les séries de prélèvements sont indiquées par des lettres différentes.

• *Analyse de l'effet « population » et de l'effet « série de prélèvement »*

Les résultats moyennés des différents indicateurs mesurés pour chaque population aux temps T1 (24h après le transfert en salle d'infection), T2 (24h avant l'infection) et T3 (24h après l'infection) sont présentés sur la figure 8.

Les résultats des ANOVA à deux facteurs à un seuil de 5% de significativité réalisées afin d'étudier les différences de ces paramètres physio-immunologiques entre les 3 séries, T1, T2 et T3, et les 2 populations sont regroupés en annexe 9 ainsi que le détail des résultats des tests PLSD de Fisher.

Aucune différence significative entre les 2 populations témoin et sélectionnée n'est mise en évidence après analyse des résultats des paramètres physio-immunologiques des séries T1, T2 et T3 en période à risque.

Des différences significatives sont observées entre les séries T1, T2 et T3 pour 7 des 8 indicateurs étudiés :

- Les **THC** obtenus à T2 sont significativement ($p < 0,0001$) plus élevés que les THC de T1 et T3 (Fig. 8,A).
- Une diminution très significative de la **CO** à T2 ($p < 0,0001$) comparée à T1 et T3 est observée (Fig. 8,B).
- La **concentration en hémocyanine** dans l'hémolymphe est significativement différente entre T1, T2 et T3. Les variations observées sont une augmentation significative ($p < 0,0001$) de la concentration en hémocyanine entre T1 et T2 d'un facteur 1,2 et une diminution de celle-ci ($p = 0,0037$) entre T2 et T3. La différence entre T1 et T3 est significative ($p < 0,0001$) (Fig. 8,C).
- La **concentration en protéines totales** dans l'hémolymphe augmente de manière significative d'un facteur 1,3 entre T1, T2 ($p < 0,0001$) et T3 ($p < 0,0001$) (Fig. 8,D).
- La **concentration en magnésium** dans l'hémolymphe augmente de façon très significative ($p < 0,0001$) d'un facteur 1,2 entre T1 et T2 et entre T2 et T3 (respectivement $p = 0,0003$ et $p = 0,0007$) (Fig. 8,E).
- La **concentration en calcium** dans l'hémolymphe augmente de manière très significative d'un facteur 1,4 entre T1 et T2 ($p < 0,0001$) et T3 ($p < 0,0001$) (Fig. 8,F).
- Par contre, aucune différence significative n'est obtenue sur les **concentrations en glucose** mesurées à chaque série (Fig. 8,G).
- On observe une augmentation très significative d'un facteur 1,7 de la **concentration en lactate** entre T1, T2 et T3 ($p < 0,0001$). Bien que la différence de concentration en lactate obtenue entre les 2 populations ne soit pas significative, il est intéressant de remarquer que la valeur de p obtenue, 0,0630, est proche du seuil de significativité (Fig. 8,H).

3.3 Comparaison des facteurs épidémiologiques

3.3.1 Prévalence de *V. penaeicida*

Les PCR réalisées sur les extraits d'ADN d'hémolymphe prélevés fin mars 2004 et fin mai 2004 ne révèlent aucune amplification spécifique de *Vibrio penaeicida*. Associées aux PCR réalisées sur les échantillons du 25 mai 2004, 4 extraits d'ADN provenant d'hémolymphe prélevées sur 4 crevettes moribondes ramassées sur le bord du bassin A2 le 28 mai 2004 étaient amplifiées. Les résultats fortement positifs (Fig. 9) des amplifications montrent que ces 4 moribondes étaient vraisemblablement affectées d'une septicémie à *V. penaeicida*.

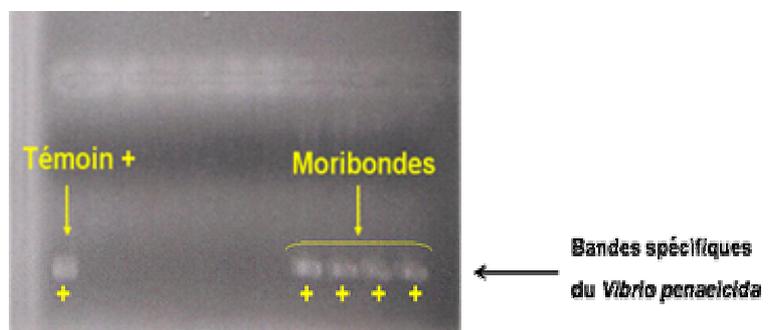


Fig. 9. Amplifications géniques spécifiques de *Vibrio penaeicida* de quelques échantillons de mai 2005.

3.3.2 Résultats complémentaires

Suite à ces résultats négatifs à 100% et contredisant les précédentes études épidémiologique (prévalence moyenne de plus de 60%, Goarant *et al.*, 2003), des analyses complémentaires ont été réalisées dans le but de tester diverses hypothèses afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats négatifs.

- Afin de tester l'hypothèse qui expliquerait ces résultats par la présence d'**inhibiteurs** dans les extraits Chelex, 2 essais d'amplification de la séquence d'ADNr 18S (présente chez tous les Eucaryotes) ont été effectuées à quelques jours d'intervalle à l'aide d'amorces universelles 18S sur 20 extraits d'ADN des échantillons du 25 mai testés pour *V. penaeicida*. Les résultats de cette PCR révèlent une amplification d'ADN de 15 extraits sur 20. Il n'est donc pas exclu qu'il y ait un phénomène d'inhibition, mais cela ne peut expliquer que 100% des échantillons soient négatifs. De plus, les résultats tous négatifs, y compris le témoin positif, de la seconde amplification génique des mêmes échantillons révèlent un problème net de répétabilité des PCR.

- Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le **seuil de détection** serait trop élevé, plusieurs amplifications d'une gamme de sensibilité, à 5,5, 55, 550 et 5500 UFC de *V. penaeicida* ont été réalisées. La première PCR (Fig. 10) révèle une amplification parfaite à ces 4 concentrations en *Vibrio* et permet de fixer un seuil inférieur de détection à 5,5 UFC par extrait Chélex. Les résultats tous négatifs des autres amplifications de cette même gamme confirment le problème de répétabilité des PCR.

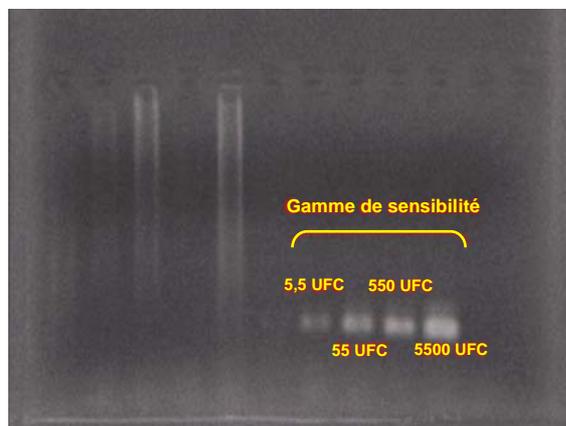


Fig. 10. Amplification de la gamme de sensibilité à 4 concentrations en *V. penaeicida*.

- Plusieurs séries d'amplifications ont été réalisées afin de tester les différents réactifs de PCR. Aucune conclusion n'a pu être tirée compte tenu de la non-répétabilité des amplifications.
- Seule l'hypothèse d'un dysfonctionnement du thermocycleur reste à être testé et notamment le thermorégulateur à l'aide de microsondes de température.

Suite à ces analyses complémentaires, les résultats de prévalence nulle de *Vibrio penaeicida* obtenus sur les échantillons ne peuvent être considérés comme validés, ni exploités. Les échantillons sont archivés et seront analysés quand les problèmes techniques seront résolus. Aucun résultat sur les prévalences ne sera donc considéré dans ce rapport.

4 Discussion

Dans un contexte où les mortalités de type Syndrome 93 sont sous l'influence de nombreux facteurs qui ne sont pas nécessairement tous identifiés et dont on n'arrive pas à isoler les effets, les survies des deux populations en condition de grossissement sont les résultats susceptibles de refléter au mieux la réponse à la sélection. Même si cette information est brute, elle reste un des résultats qui représente un grand intérêt du point de vue des aquaculteurs. Alors que la survie estimée des animaux sélectionnés de la génération 3 était significativement supérieure à celle des témoins et correspondait à une augmentation du nombre de survivants de 16% et 14% respectivement pour les bassins suivis en 2003 (Goyard *et al.*, 2003a), les survies finales des populations témoin et sélectionnée aux épisodes de mortalités du Syndrome 93 obtenues dans les bassins de terre en 2004 rendent compte d'une meilleure survie des témoins qui s'élève à 38% contre 35% pour la population sélectionnée ($p=0,0054$).

En ce qui concerne les infections expérimentales, il convient de remarquer que sur 5 infections parmi les 7 effectuées, les effectifs d'animaux sélectionnés survivants sont supérieurs aux effectifs des témoins, ainsi que sur 7 doses sur 9 testées pour les 3 infections par injection après acclimatation en salle expérimentale. Mais cette tendance, illustrée par un taux de survie global des survivants sélectionnés de 75% et des survivants témoins de 68%, n'est pas validée statistiquement. Au total, l'analyse de l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ne révèle pas une meilleure aptitude significative en terme de résistance à une infection à *Vibrio penaeicida* de la population sélectionnée que ce soit hors période à risque, en période à risque ou en condition d'infection expérimentale. Cette absence de différence contredit les résultats obtenus sur la génération 3 qui révélaient notamment de meilleures survies de la population sélectionnée en condition d'infection expérimentale.

En d'autres termes, les résultats obtenus sur les performances de la quatrième génération de la population sélectionnée ne confirment pas ceux de la troisième génération. Une double question se pose donc et mérite d'être discutée. Cette absence de différence provient-elle :

- * des **méthodes de comparaison** pas ou peu adaptées au contexte pathologique ou pas assez sensibles et qui n'auraient pas permis une mise en évidence d'éventuelles différences existant réellement entre les 2 populations ?
- * ou des **populations** témoin et sélectionnée elles-mêmes et de leurs caractéristiques génétiques ?

Il apparaît nécessaire de revenir rapidement sur le contexte de cette étude inscrite autour du problème des mortalités du Syndrome 93, et notamment, sur deux points particuliers.

➤ L'état actuel de la recherche au sujet du Syndrome 93 se situe encore dans la phase de collecte de données, d'informations, de prospection qui précède la phase d'élaboration d'un schéma de compréhension du phénomène. Ainsi, le Syndrome 93 ne présente pas les caractéristiques d'une pathologie mono-factorielle, mais plutôt d'une pathologie dont les mortalités induites seraient le résultat de l'intégration de nombreux facteurs physiologiques, immunologiques, environnementaux dont on saisit encore mal les rôles propres à chacun, encore moins les interactions. Les connaissances actuelles sur le Syndrome 93 s'accordent seulement à donner : 1. à *Vibrio penaeicida* une responsabilité dans les mortalités observées en bassin de grossissement et 2. aux chutes de température le rôle de « déclencheur » de ces mortalités. La **complexité** de cette pathologie saisonnière n'est pas encore cernée et constitue une limite considérable à l'élaboration de plans expérimentaux pertinents et ciblés visant la description et la compréhension du phénomène.

➤ Un deuxième point concerne l'état et les caractéristiques propres du matériel biologique vivant, ni statique, ni standard, à comparer dans cette étude. La difficulté de standardiser l'état physio-immunologique de la crevette, qui est également sous l'influence de nombreux paramètres, complique également l'interprétation des résultats. Cette difficulté de standardisation, qui implique un « bruit de fond » rendant difficile la reproductibilité des expérimentations et l'interprétation des données, se retrouve à deux échelles différentes :

- une échelle que l'on peut qualifier d'« interne » et qui concerne l'état physiologique propre à la crevette à relier au stade de mue, au stade de développement et au portage de *V. penaeicida* qui peuvent moduler la sensibilité de la crevette ;
- une autre échelle que l'on peut qualifier d'« externe » et qui fait référence aux conditions environnementales d'élevage potentiellement génératrices de stress et pouvant modifier l'état physiologique de la crevette (hypoxie par exemple, Le Moullac *et al.*, 1998 ; Le Moullac et Haffner, 2000).

Les facteurs « internes » de variabilité de l'état physiologique pourraient être éliminés au moins partiellement par un tri des individus avant l'entrée en salle d'infection expérimentale. En effet, il a été démontré à de nombreuses reprises les modifications physiologiques et immunologiques fondamentales induites par le cycle de mue chez la crevette (Le Moullac *et al.*, 1997). En particulier, il est admis que le stade D2, lorsque la crevette est proche de la mue, est le stade le plus sensible aux variations extérieures. L'idée serait alors de tester séparément la résistance observée chez des individus en stade C et en stade D2. Le contexte et la problématique de cette étude, le temps imparti et les contraintes zootechniques et biologiques, ne nous ont pas permis de réaliser des infections expérimentales « stade par stade », mais cela constitue une perspective incontournable.

Quant à la standardisation des facteurs « externes » de variation de l'état physiologique, seule une modification complète du type d'élevage et des protocoles zootechniques pourrait la permettre. Une intensification du type d'élevage impliquant l'usage de race ways ou des bassins thermorégulés, à fonds et parois internes recouverts de liners en polyéthylène par exemple comme cela se pratique de plus en plus chez *L. vannamei* (Boyd et Clay, 2002 ; Moss, 2002, 2004), permettraient de contrôler l'environnement presque dans sa globalité : on disposerait ainsi d'individus « standardisés », ayant été soumis aux mêmes conditions ou pressions environnementales, ce qui n'est pas le cas avec des bassins de terre qui peuvent avoir leur propre évolution.

4.1 Des outils de comparaison des deux populations inadaptés ?

Un protocole d'infection expérimentale pas assez sensible ?

Le fait de ne pas avoir observé de mortalité significative dans les lots contrôles de toutes les infections expérimentales permet de s'assurer que les mortalités observées dans les lots infectés sont bien dues à l'infection par *V. penaeicida*. Néanmoins, les résultats obtenus en 2004 ne convergeant pas avec les observations passées, il est intéressant d'étudier le modèle d'infection expérimentale et de cerner les limites de celui-ci.

Quelques remarques concernant les résultats des infections expérimentales peuvent être développées et comparées aux résultats obtenus lors de la mise au point du protocole d'infection à Tahiti.

➤ La première observation concerne l'effet dose infectante sur les taux de survie des 2 populations. Le modèle d'infection expérimentale utilisé dans cette étude est inspiré du modèle d'infection expérimentale mis au point à l'IFREMER de Tahiti sur des crevettes *L. stylirostris* naïves, c'est-à-dire n'ayant jamais été en contact avec le pathogène (puisqu'il est absent de l'environnement polynésien). Ce protocole d'infection, qui utilise la même souche de *V. penaeicida* que celle de la présente étude (AM101), permet d'obtenir dans les conditions tahitiennes des résultats répétables avec une DL50 inférieure à 5 UFC/crevette et de $1,3 \times 10^4$ UFC/mL pour les infections respectivement par injection et par balnéation (Saulnier *et al.*, 2004) et a permis de démontrer la virulence élevée de cet agent infectieux et de progresser sur un certain nombre d'axes de recherche, tels que l'étude de la pathogénie et des réactions de défense de l'hôte (Saulnier *et al.*, 2004). En particulier, des expérimentations menées à Tahiti suggèrent l'existence d'une résistance acquise post-infection chez certaines crevettes survivantes d'une primo-infection.

Or, la plupart des crevettes calédoniennes étant porteuses de *V. penaeicida* (Goarant *et al.*, 2004), la réaction à l'infection est sans doute différente de celle observée chez les crevettes naïves de Tahiti et met en jeu des mécanismes qui peuvent compromettre la validité du modèle d'infection expérimentale transféré en Nouvelle-Calédonie. De plus l'effet du portage initial de la crevette sur sa sensibilité à l'infection étant susceptible de procurer à la crevette une résistance accrue (Saulnier *et al.*, 2004) et ce portage étant vraisemblablement variable en termes quantitatifs, la signification de la DL50 est largement compromise et pourrait expliquer :

- le fait que les doses utilisées en Nouvelle-Calédonie, plus élevées que la DL50 tahitienne (15,5 à 1500 UFC/crevette contre 5 UFC/crevette pour les infections par injection) provoquent en moyenne des mortalités de seulement 32% et 25% respectivement pour les lots témoins et sélectionnés.
- le fait que l'effet dose ne soit pas observé clairement lors de nos infections expérimentales, alors qu'une relation dose-survie avait été mise en évidence à Tahiti (Saulnier *et al.*, 2004) : la figure 6 met en évidence un effet dose « global » sur l'ensemble des injections représentées, mais une analyse effectuée à l'échelle de chaque infection ne révèle pas d'effet dose. On peut citer en exemple l'infection n°6 dont les taux de survie obtenus ne suivent pas un schéma d'effet-dose ainsi que les taux de survies à l'infection n°5, aux doses infectantes de 15,5, 155 et 310 UFC par crevette qui présente un minimum de survies compris entre 30% et 45% pour les lots infectés à dose moyenne.

➤ La deuxième observation concerne plus spécialement les infections par baignade réalisées au LAC. En effet, pour des doses infectantes correspondant à des multiples de la DL50 tahitienne et s'échelonnant entre 1 x DL50 tahitienne ($1,3 \times 10^4$ UFC/mL) et 8 x DL50, on obtient environ 100% de survie pour 2 infections sur 3, et 61% et 70% de survie respectivement pour les lots témoins et sélectionnés pour la baignade 3. Ce résultat illustre les difficultés de reproductibilité des expérimentations et la non transférabilité du protocole d'infection expérimentale tahitien au LAC. Toutefois, ils confirment, en conditions d'infection naturelle et en zone d'enzootie, la relative immunité de prémunition que procure le portage du pathogène montrée en conditions expérimentales à partir de crevettes naïves à Tahiti par Saulnier *et al.* (2004).

Malgré ces limites, cette différence de survie obtenue au terme des 3 infections par baignade suggère une remarque intéressante. Les survies des infections par baignade 1 et 2 réalisées hors période à risque du Syndrome 93 sont proches de 100% pour les 2 populations tandis que celles obtenues après l'infection par baignade 3, réalisée en période à risque du Syndrome 93 (28 avril 2004), sont respectivement pour la population témoin et sélectionnée de 61% et 70%. Le test du

Khi² donne la meilleure valeur obtenue toutes infections confondues, avec $p=0,07$. La balnéation réalisée en période à risque du Syndrome 93 pourrait constituer un bon modèle d'étude de l'infection à condition de réussir à standardiser les conditions initiales des individus testés.

Des paramètres physio-immunologiques peu informatifs lors d'une infection ?

La comparaison de l'état physio-immunologique des deux populations témoin et sélectionnée hors période à risque du Syndrome 93 permet de définir un état immuno-physiologique « basal », identique dans les deux populations. Dans l'hypothèse où le programme de sélection a permis d'améliorer le potentiel de résistance de la population sélectionnée, une seconde hypothèse concernant ce caractère peut alors être émise : la similarité de l'état physio-immunologique des populations observée en conditions d'élevage non-stressantes rappelle l'hypothèse évoquée précédemment selon laquelle le système de défense en jeu serait de type inductible, autrement dit qu'il ne s'exprimerait qu'en conditions stressantes, correspondant aux facteurs de risque du Syndrome 93.

Cette hypothèse n'a toutefois pas pu être vérifiée au travers de l'expérimentation réalisée en période à risque et en condition d'infection expérimentale. En effet, la comparaison des deux populations en terme d'immuno-physiologie en condition d'infection expérimentale ne révèle aucune différence significative entre les 2 populations. Cependant, les contraintes logistiques et humaines ont imposé de ne mesurer les valeurs de ces paramètres que sur des individus en stade C, stade le plus fréquent le jour du transfert. Or ce stade, qui est le plus stable, ne permet peut-être pas de distinguer une différence de réponse au niveau physio-immunologique. Il serait intéressant de faire une expérimentation similaire sur des individus en stade D₂.

On peut cependant noter que la présente étude met en évidence de fortes variations (Fig. 8) des paramètres mesurés après transfert du bassin au bacs expérimentaux, après acclimatation en salle expérimentale, et après infection. Les résultats montrent que :

- la concentration en glucose, dont la variation est considérée comme indicateur d'un stress aigu ou chronique (Hall et Van Ham, 1998) ne varie pas entre les différentes séries de prélèvements T1, T2 et T3, ce qui suggère que ce paramètre n'est pas un indicateur pertinent dans le cadre de cette étude.
- Les variations des différents paramètres pendant la période d'acclimatation (entre T1 et T2), en particulier la baisse de la capacité osmorégulatrice, qui est un bon indicateur de stress (Lignot *et al.*, 2000) et l'augmentation du magnésium (Boglio et Goarant, 1996 ; Mugnier et Justou, in Press) laissent penser que les crevettes étaient plus stressées à l'issue de cette période d'acclimatation qu'au début ou qu'après l'infection. L'infection n'ayant pas entraîné

de mortalité importante, on peut supposer que l'effet « infection » était limité. En effet, des études réalisées dans le cadre du Syndrome d'été ont mis en évidence des variations des paramètres physio-immunologiques chez des crevettes infectées comparées à des crevettes indemnes du pathogène (dans ce cas *V. nigripulchritudo*) (Mugnier *et al.*, 2003).

Les paramètres physiologiques étudiés sont surtout connus comme indicateurs d'une situation de stress ou d'inconfort liée à un facteur environnemental plutôt qu'à une infection (Mugnier et Justou, in Press), ce qui peut expliquer que seulement 2 des 8 paramètres se révèlent pertinents. Les délais impartis pour ce stage ne nous ont pas permis de finir les mises au point techniques de protocoles de mesure de deux descripteurs immunologiques porteurs d'informations sur le statut immunitaire des crevettes dans différentes conditions, ou sur l'efficacité des mécanismes de défenses mis en place en condition d'infection :

- Le système prophénoloxydase (proPO) qui conduit au phénomène de mélanisation, fait partie du système de défense immédiat des crustacés. Il est activé par l'action d'une enzyme, la phénoloxydase que l'on peut quantifier à partir d'hémocytes fraîchement prélevés (Le Moullac *et al.*, 1997 ; Sritunyalucksana et Söderhäll, 2000 ; Adachi, 2003).
- Le lysozyme, enzyme aux propriétés catalytiques des parois bactériennes, constitue également un bon indicateur de l'« activité immunitaire » des Crustacés. Le dosage de son activité dans des échantillons d'hémolymphe d'autres espèces de crevettes pénéides a déjà été réalisé (Hikima *et al.*, 2003 ; Sotelo-Mundo *et al.*, 2003) : mais il demeure néanmoins un réel problème de spécificité de l'activité enzymatique mesurée en cinétique par lecteur microplaque. Une des hypothèses qui expliquerait les problèmes de reproductibilité dans les dosages d'activité lysozymique dans les hémolymphe de crevettes est que des activités de type lysozyme ont été mises en évidence dans des produits extracellulaires bactériens (Wang et Chang, 1997 ; Kamensky *et al.*, 2003) et que l'hémolymphe des crevettes n'est pas stérile (Colwell et Liston, 1962 ; Gomez-Gil *et al.*, 1998).

Enfin, d'autres descripteurs pourraient être utilisés, à condition de disposer sur place des moyens analytiques nécessaires, notamment de biologie moléculaire : une augmentation de la concentration des pénéidines, dont l'activité contre les bactéries Gram + est connue, a été observée dans le plasma de crevettes *P. vannamei* soumises à un challenge bactérien (Destoumieux *et al.*, 2000). Ces peptides antimicrobiens sont susceptibles de constituer des bons indicateurs du statut immunitaire des crevettes.

4.2 Des populations témoins et sélectionnées mal constituées ?

La structure génétique des deux populations témoin et sélectionnée peut également être à l'origine de la non confirmation en 4^{ème} génération des résultats obtenus en 3^{ème} génération. Ceci remet en question, non plus la fiabilité, la sensibilité ou la pertinence des outils de comparaison discutés précédemment et basés sur la mesure du « phénotype », mais les caractéristiques **génétiques** propres aux populations témoin et sélectionnée **produites et étudiées**.

Si l'on accepte l'hypothèse qu'il existe une variabilité génétique pour le caractère de résistance au Syndrome 93, donc notamment à *V. penaeicida* au sein du cheptel calédonien (ce qui est possible compte tenu des résultats obtenus en sélection sur la croissance sur la population tahitienne génétiquement proche de la population calédonienne et malgré une faible variabilité génétique résiduelle globale - Goyard *et al.*, 2001 et 2003b), la question soulevée conduit à identifier et évaluer les différents facteurs susceptibles d'avoir fait évoluer les populations Témoin et Sélectionnée entre la G3 (génération 3) et la G4 (génération 4). D'une façon générale, une population donnée est soumise à 4 types de phénomènes susceptibles de faire évoluer ses caractéristiques génétiques :

- **la dérive génétique** : le hasard fait que tous les individus ne transmettent pas leurs gènes à la génération suivante dans des proportions équivalentes, si bien que les fréquences alléliques peuvent varier aléatoirement d'une génération à l'autre.
- **la sélection** : qu'elle soit spontanée ou orientée dans le cadre d'un programme génétique, la sélection est le phénomène qui conduit à favoriser la transmission de certains allèles d'une génération à l'autre, contribuant ainsi à faire évoluer les fréquences alléliques. Si la sélection a toujours lieu dans le même sens, les variations de fréquences se cumulent de génération en génération et engendrent un progrès génétique.
- **la migration** : la reproduction au sein d'une population donnée d'individus appartenant à une autre population peut conduire à modifier les fréquences alléliques de la population receveuse, et dès lors ses caractéristiques génétiques.
- **la mutation** : phénomène qui correspond à l'apparition de nouveaux allèles qui peuvent être associés, s'ils s'expriment, à de nouveaux caractères.

Dans notre cas, la migration correspondrait à une erreur humaine peu probable lors des fécondations des géniteurs issus de la G3 (par exemple fécondation de femelles sélectionnées par des mâles témoins, ou confusion entre familles G4 sélectionnées et familles G4 témoins). La mutation est en général un phénomène rare et il est peu vraisemblable qu'il ait pu affecter simultanément une proportion importante de géniteurs en 2003. L'effort d'analyse et de recherche d'explication doit donc porter sur les phénomènes de sélection, spontanée ou non, et de dérive génétique ayant affecté les 2 populations expérimentales.

Le premier élément de discussion concerne le **critère de sélection** lui-même, qui a servi à la production de la quatrième génération sélectionnée. La sélection des géniteurs destinés à la production de la population sélectionnée a été réalisée de manière empirique sur le critère de survie aux épisodes de mortalités type Syndrome 93. Même si de nombreuses études réalisées sur d'autres espèces et d'autres pathogènes ont confirmé l'efficacité de ce type de sélection rustique qui a comme avantage la mise en place d'un protocole expérimental léger (sélection de lignées d'huîtres plates *O. edulis* résistantes à la bonamiose - Naciri-Graven *et al.*, 1998 - ; sélection expérimentale d'huîtres creuses *C. gigas* résistantes aux mortalités estivales – Dégremon *et al.*, 2003 - ; sélection spontanée de *L. stylirostris* résistantes à IHHNV - Weppe *et al.*, 1992 ; Tang *et al.*, 2000 - ; sélection de *L. vannamei* résistantes au virus du Taura Syndrom – Wyban *et al.*, 1999 ; Argue *et al.*, 2002), le point faible de cette technique est l'impossibilité de standardiser la **pression de sélection** qui peut s'opérer de façon très différente à chaque génération. Le fait de ne pas maîtriser ni contrôler la pression exercée par le critère de sélection à chaque génération sur la population expérimentale fait courir le risque de sélectionner des candidats à la reproduction dont les aptitudes de résistance à une infection à *V. penaeicida* en l'occurrence, sont différentes. Ainsi, le gain significatif de survie en saison froide de la troisième génération sélectionnée peut être le fruit d'une forte pression de sélection exercée sur les futurs géniteurs en 2002, alors que cette dernière a pu être moindre en 2003 et éventuellement plus faible qu'un **effet de dérive** dans le mauvais sens.

Le second élément de discussion concerne la structure même de la **population témoin**. Rappelons tout d'abord que la faible longévité des crevettes (12-15 mois) et l'absence de techniques de cryoconservation d'embryons et/ou de gamètes de crevettes ne permettent pas de disposer d'une population témoin au sens strict du terme comme il peut être fait en sélection génétique végétale par exemple. Il ne s'agit donc pas d'une population témoin qui n'aurait subi ni sélection spontanée ni dérive génétique entre la première et la quatrième génération, mais d'une population issue de la population originelle préservée seulement des périodes de Syndrome 93 et reproduite selon un protocole d'élevage correspondant à la pratique habituelle de la profession.

L'analyse des données de production de cette population témoin à chaque génération dévoile deux événements qui ont pu biaiser la qualité de cette population en temps que témoin :

➤ Les effectifs des géniteurs utilisés à la production des générations témoins et sélectionnés, regroupés dans le tableau 9, mettent en évidence que seulement 5 mâles et 5 femelles sont à l'origine du lot témoin testé en quatrième génération dans le cadre de cette étude. Ceci est lié d'une part aux faibles effectifs de géniteurs témoins obtenus en fin de cycle à la suite de problèmes zootechniques rencontrés en seconde phase de grossissement, après période à risque de Syndrome 93, et d'autre part à des accidents lors de l'élevage larvaire ayant permis la production des G4, et

qui ont eu pour conséquence que les effectifs de 6 familles témoins parmi les 11 produites étaient juste suffisants pour constituer les lots de futurs géniteurs témoins élevés à faible densité.

Tableau 9. Nombre de géniteurs utilisés à chaque génération pour produire les 2 populations expérimentales testées.

Population	Témoin		Sélectionnée		
	Génération	Nombre de mâles	Nombre de femelles	Nombre de mâles	Nombre de femelles
G0		14	22	9	13
G1		13	13	15	15
G2		14	14	13	13
G3		13	13	18	18
G4		5	5	15	15

Ceci a une conséquence potentielle : la **dérive génétique** entre la G3 et la G4 témoin a pu être très forte et les 10 géniteurs « tirés au hasard » au sein de la population témoin peuvent avoir été des géniteurs « exceptionnels ». En d'autres termes, le hasard en 2003 peut avoir fait aussi bien que la sélection de 2000 à 2003.

➤ Une forte **pression de sélection** autre que le Syndrome 93 peut avoir affecté la population G3 témoin avant sa reproduction. En effet, l'analyse des données zootechniques concernant les élevages des bassins de terre destinés à la production des géniteurs témoins, bassins dont la caractéristique propre est une faible densité afin de ne pas induire de pression de sélection type Syndrome 93 sur les individus témoins, révèle que les survies finales des bassins des futurs géniteurs de la génération 3 témoin ont été très faibles, à savoir de 13%. Selon les observations *in situ* faites tout au long de l'élevage, les 87% de mortalité ne correspondaient pas à une mortalité de type Syndrome 93 mais bien à des mortalités dues à de mauvaises conditions environnementales mais qui n'ont pas pu être identifiées. En d'autres termes, la quatrième génération témoin a été produite à partir des géniteurs témoins G3 qui avaient survécu à cette pression environnementale spontanée probablement non négligeable et qui, par voie de conséquence, présentaient des meilleures aptitudes à tolérer des conditions d'élevage extrêmes et peut-être un meilleur comportement vis-à-vis du pathogène, ou d'autres *Vibrio* pathogènes. Les géniteurs G3 qui se sont reproduits n'étaient sans doute pas représentatifs de la G3 témoin.

Pour conclure, il est fort probable que la G4 témoin ne présente pas les caractéristiques d'une population témoin qui n'aurait subi ni dérive (illustrée par le faible effectif de géniteurs), ni pression de sélection (illustrée par les mortalités massives dans les bassins destinés à la production de géniteurs témoins). Cela pourrait expliquer qu'aucune différence entre G4 témoin et G4 sélectionnée ne soit enregistrée cette année.

L'outil de comparaison ne présentant plus les caractéristiques qui lui valaient cette fonction, cette différence contraire à celle attendue entre les deux populations ne pourrait alors plus être interprétée en terme de manque de progrès génétique de G3 à G4 sélectionnée. Ces éléments sont à rapprocher du fait que les survies de 35%-41% obtenues en saison froide 2004 par les 2 G4 expérimentales (sélectionnée et témoin) sont *a priori* plutôt bonnes, même s'il faudrait avoir recours à des séries historiques à l'échelle de la filière et à l'analyse des données climatiques pour l'affirmer.

5 Conclusion et perspectives

La quatrième génération de la population sélectionnée ne présente pas, contrairement à l'attendu, une meilleure résistance à une infection expérimentale ou environnementale à *Vibrio penaeicida* que la population ayant servi de témoin. Une analyse rapide de ces résultats pourrait conduire logiquement à l'arrêt de cette action de recherche. Il s'agit pour les gestionnaires des programmes de recherche d'accepter ou de refuser l'un des risques suivants : mener une action de recherche qui se solde en final par un échec ou passer à côté d'une solution à proposer aux aquaculteurs mais dont le bien-fondé reste à démontrer. Compte tenu des enjeux liés à la diffusion éventuelle d'une population améliorée (gain de productivité et de rentabilité), plusieurs arguments en faveur de la poursuite de ce programme et de la production d'une cinquième génération témoin et sélectionnée peuvent être avancés.

De plus, il faut rappeler que plusieurs programmes d'amélioration génétique en aquaculture ont subi des « péripéties » équivalentes lors des premières générations de sélection avant de démontrer leur réelle efficacité (sélection croissance chez *L. stylirostris* – Goyard *et al.*, 2001- et chez certains poissons –Bédier, com. pers.-).

Ensuite, le problème rencontré au sujet de la représentativité de la population témoin peut être au moins partiellement rattrapé pour la cinquième génération. En effet, les individus issus des 6 familles témoins de la G4 qui proviennent des premiers essais de production de la quatrième génération et qui n'ont pu être testées pour des questions d'effectifs disponibles en élevage larvaire, ont été conservés et élevés. La génération témoin 5 pourra donc être produite à partir de ces 6 familles non-testées en 2004 et des 5 familles testées. Ceci limitera considérablement une des causes possibles de l'absence de différence observées dans nos expérimentations, à savoir la dérive génétique du témoin. Avec un effectif génétique de 22 reproducteurs, la variabilité génétique du témoin aura été maintenue de façon acceptable. On peut également suggérer d'inclure une nouvelle population témoin, issue de post-larves fournies par une éclosierie de production. Il s'agirait d'associer à l'étude comparative une population représentative des populations élevées dans les

bassins de production. Cette nouvelle population pourrait être qualifiée de « témoin de développement » : elle ne présenterait pas la même base génétique que les deux autres populations, mais serait indemne de tout « biais » comme ceux qui ont pu apparaître au cours des 4 générations des deux populations testées jusqu'à présent. Trois populations seraient alors comparées au cours de l'année 2005.

Enfin, les données plurifactorielles du programme DESANS, qui vise à long terme l'élaboration d'un modèle rendant compte des mécanismes de cette pathologie, pourront sans doute apporter des informations nouvelles concernant les interactions hôte-environnement-pathogène mises en jeu dans cette pathologie et permettront peut-être de mieux choisir les descripteurs étudiés dans le suivi de la réponse corrélée à la sélection et d'ajuster les protocoles expérimentaux de comparaison d'animaux présentant des génotypes ou des parcours zootechniques différents, comme de proposer d'éventuelles autres pressions de sélection pour le Syndrome 93.

Si cette action de recherche est prolongée, l'étude de la prévalence du pathogène *V. penaeicida* sera incontournable pour mieux comprendre la nature de la résistance ou de la tolérance des animaux améliorés. Mais en tout état de cause, il sera également prudent, avant toute diffusion de la souche ou avant transfert de la méthode de sélection aux écloséries privées de s'assurer que la sélection ne s'est accompagnée d'aucune contre-sélection sur les mécanismes de résistance à l'IHHNV et de vérifier que la prévalence du virus IHHN pour lequel le cheptel calédonien présente un certain niveau de résistance n'est pas supérieure chez la population améliorée. Si c'était le cas, le risque de constituer des foyers d'IHHNV en zone d'élevage serait réel et il conviendrait de le gérer.

Références bibliographiques

- Adachi K., Hirata T., Nishioka T., Sakaguchi M.** (2003). Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Biochemistry and Molecular Biology* 134:135-141.
- 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.
- Aquacop** (1984). Review of ten years of experimental Penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). *J. World Maricul. Soc.* 15: 73-91.
- Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M., Moss S.M.** (2002). Selective breeding of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrom Virus. *Aquaculture* 204 (3-4):447-460.
- Boglio E., Goarant C.** (1996). Hemolymph magnesium as a measure of acute physiological stress in wild broodstock *Penaeus monodon* and cultured broodstock *P. stylirostris*. In *Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and shrimps*, p. 101. Iloilo, Philippines.
- Boyd C.E., Clay J.W.** (2002). Evaluation of Belize Aquaculture Ltd : A Superintensive Shrimp Aquaculture system » Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17p.
- Chen J.C., Cheng S.Y.** (1993). Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology* 27, 281-292.
- Colwell R.R., Liston J.** (1962). The natural bacterial flora of certain marine invertebrates. *Journal of Insect pathology* 4:23-33.
- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Le Groumellec M., Grimont P.** (1998). Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164:297-309.
- Dégremont L., Boudry P., Soletchnik P., Bédier E., Ropert M., Huvet A., Moal, J., Samain J.F.** (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. *J. Shellfish Res.* 22(1): 327.
- Destoumieux D., Munoz M., Cosseau C., Rodriguez J., Bulet P., Comps M., Bachère E.** (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science* 113, 461-469.
- Drach P., Tchernifovtzeff C.** (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596-609.
- Goarant C., Herlin J., Ansquer D., Brizard R., Marteau A.L.** (2004). *Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives. Actes du colloque "Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie". Sous presse.
- Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A.L., Martin C., Martin B.** (2000). Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 40, 101-107.
- Goarant C., Mérien F., Berthe F., Mermoud I., Pérolat P.** (1999). Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio spp.* pathogenic for shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1145-1151.
- Godin D. M., Carr W. H., Hagino G., Segura F., Sweeney J. N., Blankenship L.** (1995). Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 139, 243-248.
- Gomez-Gil B., Tron-Mayen L., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Guerra-Flores A.L.** (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1-9.
- 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.

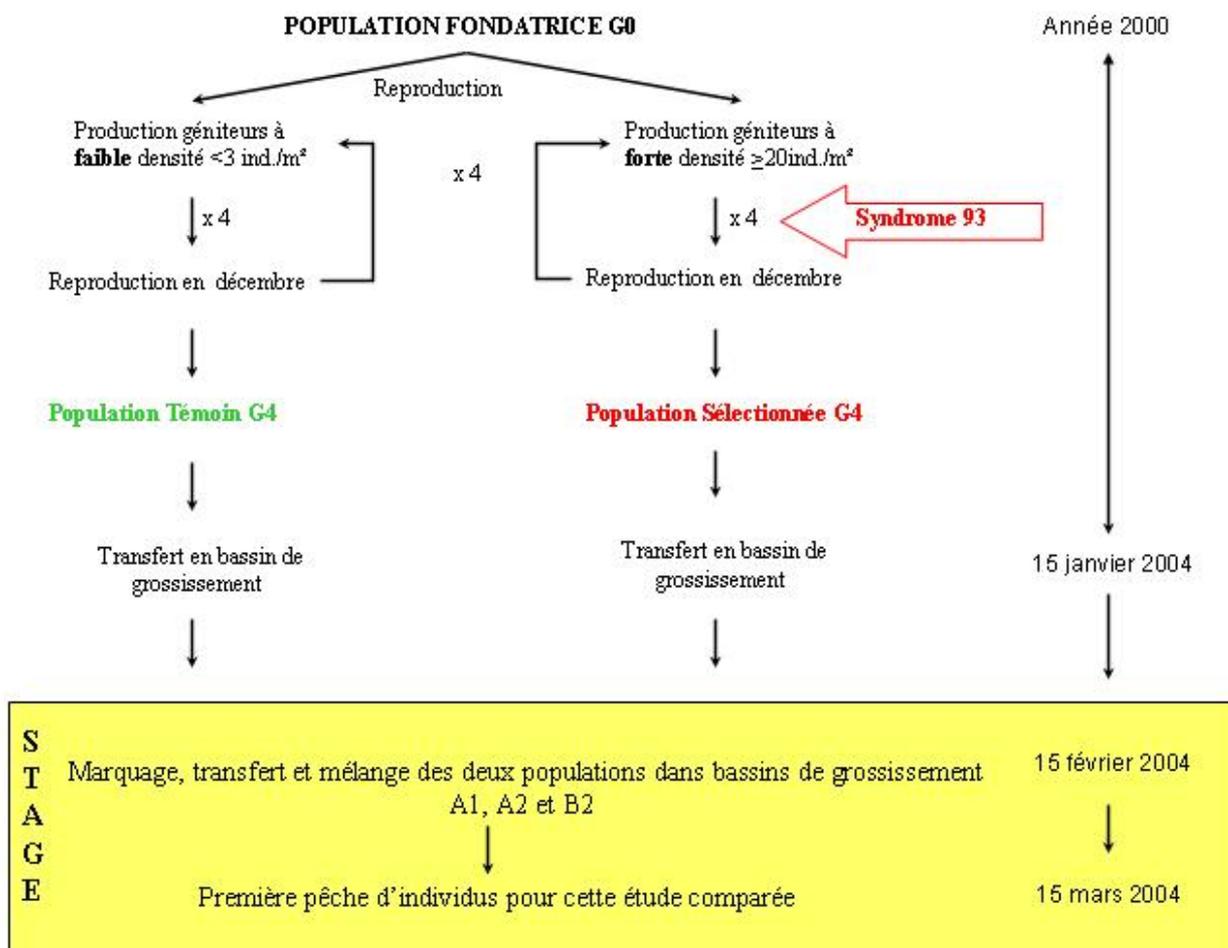
- Goyard E., Goarant C., Bachère E., de Lorgeril J., Mugnier C., Ansquer D., Broutoi F., Brun P., Imbert F., Justou C., Maillez J.R., Patrois J., Pham D., Peignon J.M.** (2003a). Amélioration génétique expérimentale de la crevette d'élevage de Nouvelle-Calédonie : Sélection d'une population de *L. stylirostris* résistante à la bactérie pathogène *Vibrio penaeicida*. Rapport scientifique et technique DRV/RST/RA/2003-14 ; 24p.
- Goyard E., Arnaud S., Vonau V., Bishoff V., Mouchel O., Pham D., Wyban J., Boudry P., Aquacop** (2003b). Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New-Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations, *Aquat. Living Resour.* 16 (2003) 501–508.
- Goyard E., Peignon J.M., Vonau V., Goarant C., Imbert F., Pham D., Patrois J.** (2004). Genetic Improvement of pacific Blue Shrimp adresses Syndrome 93 in New Caledonia. *Global Aquaculture Advocate*, Volume 7, issue 2, pp 86-87.
- Hall M.R., Van Ham E. H.** (1998). The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 290-299.
- Hikima S., Hikima J.-I., Rojtinnakorn J., Hirono I., Aoki T.** (2003). Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 316:187-195.
- Kamensky M., Ovadis M., Chet I., Chernin L.** (2003). Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 323–331.
- Le Moullac G., Haffner P.** (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121-131.
- Le Moullac G., Le Groumellec M., Ansquer D., Froissard S., Lévy P., Aquacop** (1997). Haematological and phenoloxydase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle : protection against vibriosis. *Fish and shellfish immunology* 7:227-234.
- Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre J-C., Levy P.** (1998). Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and shellfish immunology* 8:621-629.
- Lefèvre J., Lemonnier H., Goarant C., Blanchot J.** (2004). Evolution des paramètres physico-chimiques et biologiques des bassins d'élevage de crevette avant et pendant des mortalités de type « Syndrome 93 ». Actes du colloque "Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie". Sous presse.
- Lemaire P., Bernard E., Martinez-Paz J.A., Chim L.** (2002). Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209, 307-317.
- Lignot J.H., Spanings-Pierrot C., Charmantier G.** (2000). Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209-245.
- Liu C.H., Yeh S.T., Cheng S.Y., Chen J.C.** (2004). The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish & Shellfish Immunology* 16 (2004): 151-161.
- 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.
- Mugnier C. and Soyez C.** (2001). Effect of temperature decrease, hypoxia and molt stage on osmoregulatory capacity and survival in the penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In Fifth International Crustacean Congress. Melbourne 9-13 July, Melbourne, Australia.
- Mugnier C., Justou C. et le personnel du LAC** (2003). La crevette et le Syndrome d'été en Nouvelle-Calédonie : quelles réponses physiologiques et immunitaires ? Résultats préliminaires du programme DESANS, Colloque Styli 2003.
- Mugnier C., Justou C.,** in Press. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

- Moss S.M.** (2002). Marine shrimp farming in the Western Hemisphere: Past problems, present solutions, and future visions. *Reviews in Fisheries Science* 10:601-620.
- Moss S.M.** (2004). Biosecure, zero-exchange shrimp production technology (Biozest): project overview; *World Aquaculture 2004. Book of Abstracts. Aquaculture Society Special Publication* : p. 415.
- Naciri-Graven Y., Martin A.-G., Baud J.-P., Renault, Gérard A.** (1998). Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*. 224: 91-107.
- 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., Cochenec-Laureau N.** (2004). Apports d'un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves pour l'étude d'une vibriose. *Actes du colloque "Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie"*. Sous presse.
- Sotelo-Mundo R.R., Islas-Osuna M.A., de la Re-Vega E., Hernandez-Lopez J., Vargas-Albores F., Yepiz-Plascencia G.** (2003). cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and shellfish immunology* 15:325-331.
- Sritunyalucksana K., Söderhäll K.** (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191:53-69.
- Tang K.F.J., Durand S.V., White B.L., Redman R.M. Pantoja C.R., Lightner D.V.** (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture* 190 (3-4), 203-210.
- Weppe M., Bonami J.R., Lightner D.V., Aquacop** (1992). Demonstracion de 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.*
- Wang S.L., Chang W.T.** (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 380–386.
- 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.*

Annexes

- Annexe 1.** Schéma de sélection des deux populations témoin et sélectionnée.
- Annexe 2.** Composition du milieu de culture ZoBell ou Marine Broth (milieu de culture de la flore marine hétérotrophe totale).
- Annexe 3.** Régression de la concentration bactérienne des cultures de *Vibrio penaeicida* AM101 en fonction de la densité optique obtenue après lecture au spectrophotomètre à 600nm.
- Annexe 4.** Principes des protocoles de mesures et dosages des indicateurs physiologiques et immunologique étudiés.
- Annexe 5.** Caractéristiques de la PCR pour l'évaluation des prévalences de *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000).
- Annexe 6.** Méthode d'extraction d'ADN au Chélex.
- Annexe 7.** Méthode d'extraction d'ADN au phénol chloroforme.
- Annexe 8.** Cinétiques des mortalités des infections par injection 4, 5, 6 et 7.
- Annexe 9.** Résultats détaillés des ANOVA réalisées sur les données physio-immunologiques d'avril 2004.

Annexe 1. Schéma de sélection des deux populations témoin et sélectionnée.



Annexe 2. Composition du milieu de culture ZoBell ou Marine Broth (milieu de culture de la flore marine hétérotrophe totale).

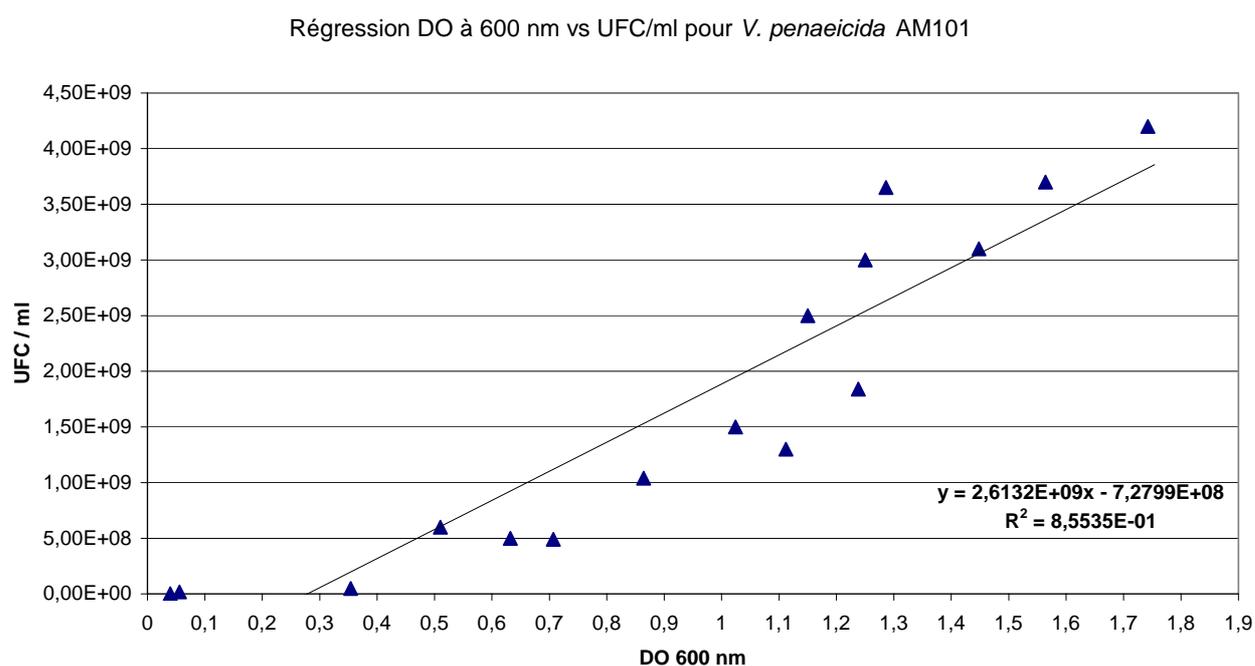
Composition :

- 15 g d'Agar
- 4 g de peptone
- 1 g d'extrait de levure
- 1 litre d'eau de mer artificielle (Instant Ocean, Aquarium System) à 25‰
ou
750 mL d'eau de mer stérile+ 250 mL d'eau distillée

Ajuster le pH à 7,6-7,8 à froid.

Autoclaver à 121°C, 1 bar, 20 min.

Annexe 3. Régression de la concentration bactérienne des cultures de *Vibrio penaeicida* AM101 en fonction de la densité optique obtenue après lecture au spectrophotomètre à 600nm.



Annexe 4. Principes des protocoles de mesures et dosages des indicateurs physiologique et immunologique étudiés.

Comptage hémoctaire (THC) :

Le comptage des hémoctes totaux (THC) est réalisé dans une cellule de Malassez à l'aide d'un microscope Leica DMLB au grossissement x400 en contraste de phase sur un échantillon de 10 μ L d'hémolymphe mélangés à 30 μ L de solution d'Alsever additionnée de 15% de formol et conservé à 4°C jusqu'au comptage.

Mesure de la pression osmotique et calcul de la capacité osmorégulatrice CO :

Dix μ L d'hémolymphe ont été déposés immédiatement après le prélèvement dans un osmomètre à tension de vapeur Wescor 5500® pour la mesure de la pression osmotique (PO). La PO de l'eau du bassin ou des bacs a également été mesurée. La capacité osmorégulatrice (CO) correspond à la différence de PO entre l'eau de mer et l'hémolymphe des crevettes. PO et CO sont exprimées en mOsm.L⁻¹.

Dosage de l'hémocyanine :

Le dosage de l'hémocyanine a été réalisé sur 10 μ L d'hémolymphe dilués dans 390 μ L d'eau distillée au moment du prélèvement. La lecture de la densité optique (DO) a été réalisée au spectrophotomètre (Spectronic Genesys 5) à 335nm contre de l'eau distillée. Cette longueur d'onde correspond à l'absorption maximale de l'oxyhémocyanine.

La concentration (mol.L⁻¹) en hémocyanine a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction $E_{1\text{cm}}^{\text{mM}}$ de 17.26 (Chen et Cheng, 1993). La concentration en g.L⁻¹ (mg.mL⁻¹) a été calculée en attribuant une valeur de 74000 à la sous-unité fonctionnelle de l'hémocyanine (Antonini et Brunori, 1974, cités dans Chen et Cheng, 1993).

Dosage des protéines totales :

Les protéines totales sont dosées par une méthode colorimétrique basée sur la méthode de Lowry et réalisée en microplaque. Le dosage est réalisé sur 40 μ L d'échantillon et sur 100 μ L d'une gamme étalon de 0 à 80 μ g de Bovine Serum Albumine (BSA). Deux 200 μ L d'une solution constituée de carbonate de sodium 2% dans NaOH 0.1N, de sulfate de cuivre 0.5% et de tartrate de sodium 1% sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante (TA), 15 μ L de solution de Folin-Ciocalteu 0.5N sont ajoutés et la lecture de la DO se fait à 620nm dans un lecteur microplaque (Digiscan Asys Hitech 340) après 30mn d'incubation à TA. Les résultats sont exprimés en mg.mL⁻¹.

Dosage du magnésium :

Le dosage du magnésium est réalisé sur un échantillon de 5 μ L à l'aide d'un kit Biomérieux. Le principe de ce dosage est basé sur la formation d'un complexe coloré. La lecture se fait sur microplaque au spectrophotomètre à 550nm.

Dosage du calcium :

Le dosage du calcium est réalisé sur un échantillon de 5 μ L à l'aide d'un kit Biomérieux. Le principe de ce dosage est une réaction enzymatique avec l'indicateur bleu de méthylthymol. La lecture se fait sur microplaque au spectrophotomètre à 620nm.

Dosage du glucose :

La déprotéinisation est une étape préalable au dosage du glucose. 25 μ L d'échantillon sont ajoutés à 50 μ L d'acide perchlorique 6% à 4°C, puis centrifugés pendant 15mn à 13000g à 4°C. 50 μ L du surnageant sont récupérés et le pH est neutralisé par l'ajout de 7 μ L de KOH, 3M (B. Paterson, com. pers.). Les échantillons ainsi traités sont conservés à -80°C en attente de dosage. Le glucose est dosé sur le même plasma déprotéinisé que pour le lactate (dilution 1/6) à l'aide d'un kit SIGMA Diagnostics Glucose (Trinder). Le principe de ce dosage enzymatique repose sur l'oxydation du glucose et la formation d'une substance colorée, la quinonéimine, absorbant à 505 ou 492nm. Les concentrations en glucose sont mesurées sur 10 μ L d'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg.dL⁻¹.

Dosage du lactate :

La déprotéinisation est une étape préalable au dosage du lactate et est réalisée sur le même échantillon que pour le dosage du glucose.

Le lactate est dosé dans le plasma déprotéinisé, dont la dilution finale due à l'anticoagulant et la déprotéinisation est de 1/6, à l'aide du kit Biomérieux Lactate PAP par une méthode enzymatique. Le dosage est réalisé sur 10 μ L d'échantillon. La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 492nm. Les résultats sont exprimés en mg.dL⁻¹.

Annexe 5. Caractéristiques de la PCR pour l'évaluation des prévalences de *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000).

- Les séquences des amorces utilisées sont :

Sens VpF	5'-GTGTGAAGTTAATAGCTTCATATC-3'
Antisens VR	5'-CGCATCTGAGTGTCAGTATCT-3'

- Le profil thermique est :

Dénaturation initiale :	94°C pdt 5mn.
Nombre de cycles :	35
dénaturation	94°C pdt 1mn.
appariement	58°C pdt 1mn.
élongation	72°C pdt 1mn
Elongation finale :	72°C pdt 5mn.

- La concentration de MgCl₂ utilisée est celle déterminée par Saulnier *et al.* (2000), de 2,5mM finale.

Solutions

*solution de chélex à 5%:

chélex	5 g
H ₂ O mQ	100 mL (+ agitateur magnétique)

Autoclaver et conserver à 4°C.

*protéinase K:

Tris pH8	100 mM (12,1 g/L)
protéinase K	500 µg/mL

Protocole

- *Déposer 400 µL de solution de chélex à 5%, sous agitation magnétique, dans un Eppendorf stérile;
- *Verser 40 µL de solution de protéinase K;
- *Ajouter ensuite 10 µL d'hémolymphe ou un morceau de pléopode à tester (prélèvement en solution d'Alsever);
- *Vortexer brièvement le tout;
- *Mettre à incuber 4 à 5 heures dans un bain marie à 56°C;
- *Incuber ensuite 15 minutes à 100°C;
- *Vortexer brièvement;
- *Mettre immédiatement sur glace;
- *Centrifuger brièvement (condensation au niveau du bouchon) ;
- *Prélever 100 µL de surnageant pour le tube de secours et congeler le reste de l'échantillon à -20°C;
- *Lors de la réutilisation de l'échantillon chélex, prendre soin de le faire **décongeler sur glace**.

Remarque

Afin de s'assurer de la fiabilité de l'extraction d'ADN au Chélex d'une part et de l'absence d'inhibiteurs dans le mélange réactionnel des PCR d'autre part, des PCR de séquences spécifiques de l'ADNr 18S des eucaryotes ont été effectués sur des échantillons du 25 mai à l'aide d'amorces universelles (CS1 et CAS2)

Annexe 7. Méthode d'extraction d'ADN au phénolchloroforme.

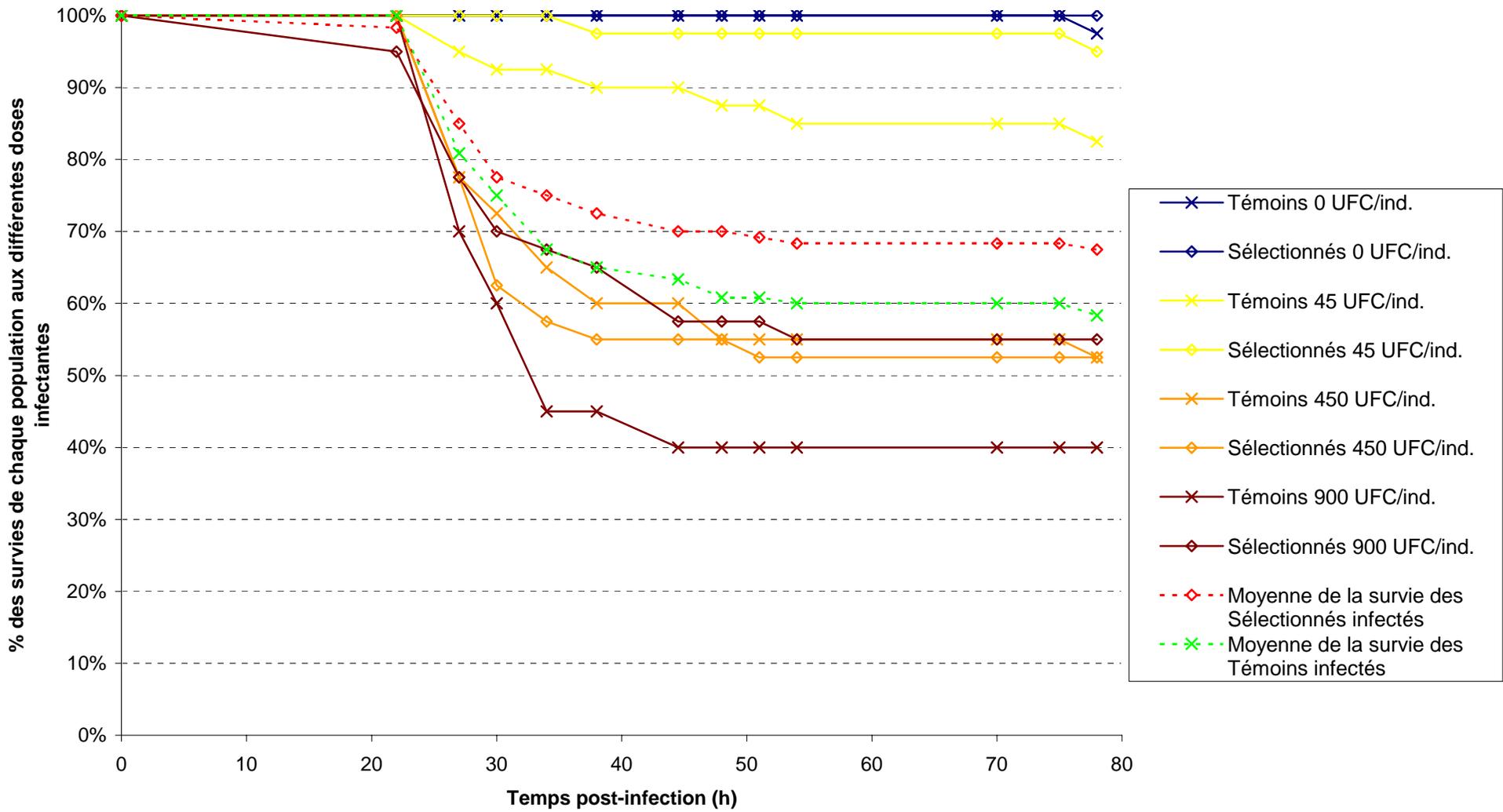
Milieux

*Ethanol 100%	
*Ethanol 70%	
*Chloroforme	
*Alcool isoamylique	
*Acétate de sodium	408.24 g/L (3 M) pH 5.2
*Tampon de lyse: (en l'absence de protéinase K se conserve à température ambiante)	
NaCl	5.85 g/L (100 mM)
Tris-HCl	1.576 g/L (10 mM)
EDTA	9.305 g/L (25 mM)
SDS	5 g/L (0.5%)
pH	8
Protéinase K (labile en tampon de lyse et à préparer extemporanément)	0.1 µg/mL

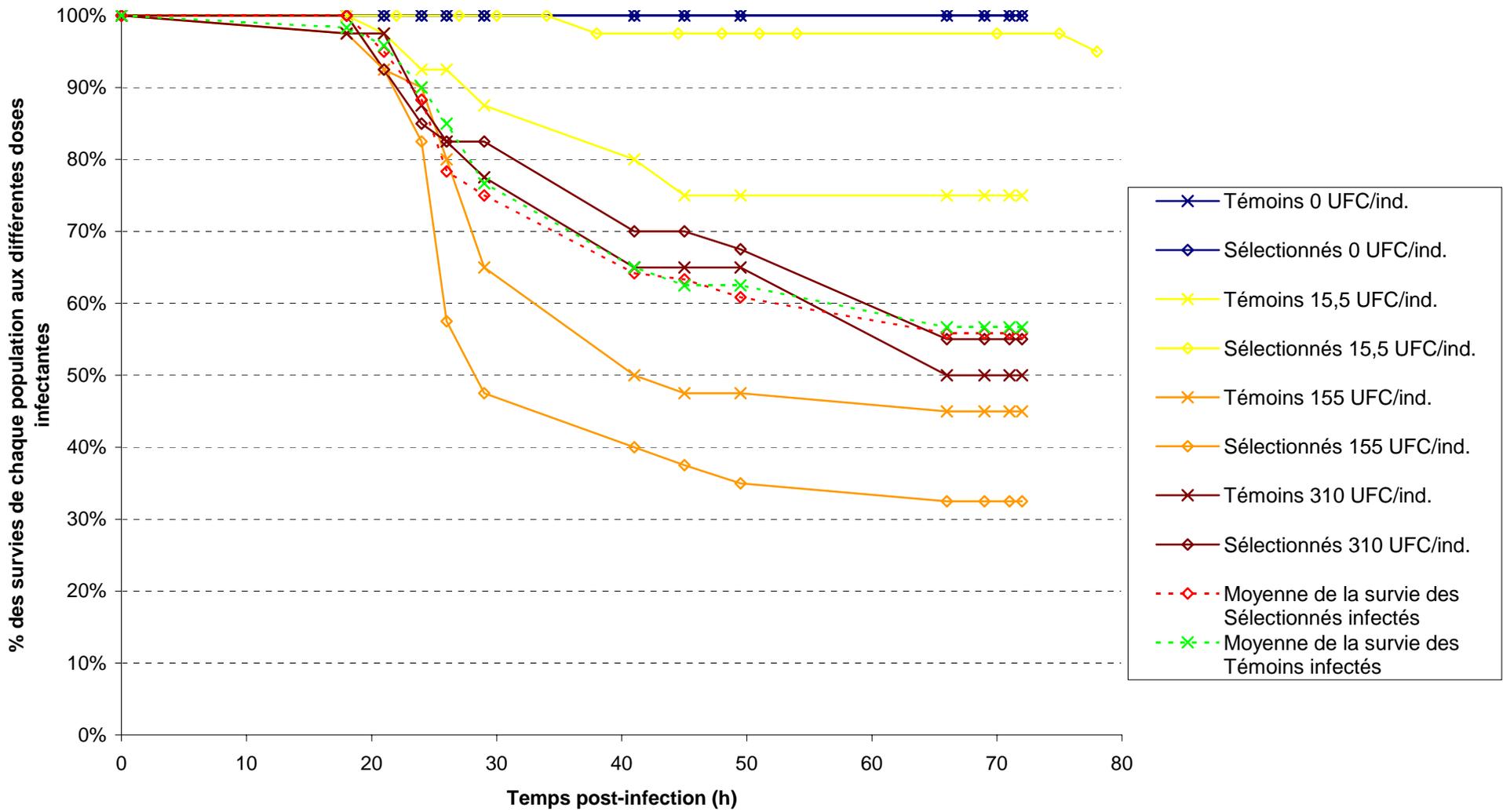
Protocole

- *Mettre les bactéries en culture dans 10 mL de ZoBell, dans des tubes à hémolyse de 20 mL;
- *Centrifuger 1.5 mL de milieu 5 minutes à 10000g dans un tube Eppendorf de 1.5 mL;
- *Reprendre le culot dans 400 µL de tampon de lyse en vortexant jusqu'à remise totale en suspension des bactéries;
- *Laisser incuber 1 heure à 56°C (en vortexant de temps en temps si le culot n'est pas re-suspendu entièrement);
- *Ajouter 400 µL d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1);
- *Vortexer pendant 15 secondes;
- *Centrifuger 5 mn à 10000g ;
- *Récupérer la phase supérieure dans un nouvel Eppendorf;
- *Verser 40 µL d'acétate de sodium 3M;
- *Vortexer puis ajouter 800 µL d'éthanol absolu glacial;
- *Observer la formation d'un précipité d'ADN (méduse), et centrifuger 5 min à 10000g (s'il n'y a pas de méduse visible, mettre les tubes à -20°C, voire -80°C jusqu'à leur obtention);
- *Centrifuger 10 mn à 10000g ;
- *Jeter le surnageant (l'éthanol);
- *Ajouter délicatement l'éthanol glacial à 70%;
- *L'enlever aussitôt, et laisser sécher sous la hotte ;
- *Reprendre le culot dans 100 µL d'eau distillée + RNase à 50 µg/mL finale ;
- *Vortexer brièvement;
- *Analyser un aliquot d'ADN sur gel d'agarose 0.7% ou par spectrophotométrie à 260 et 280 nm;
- *Conserver les échantillons à -20°C ou mieux -80°C.

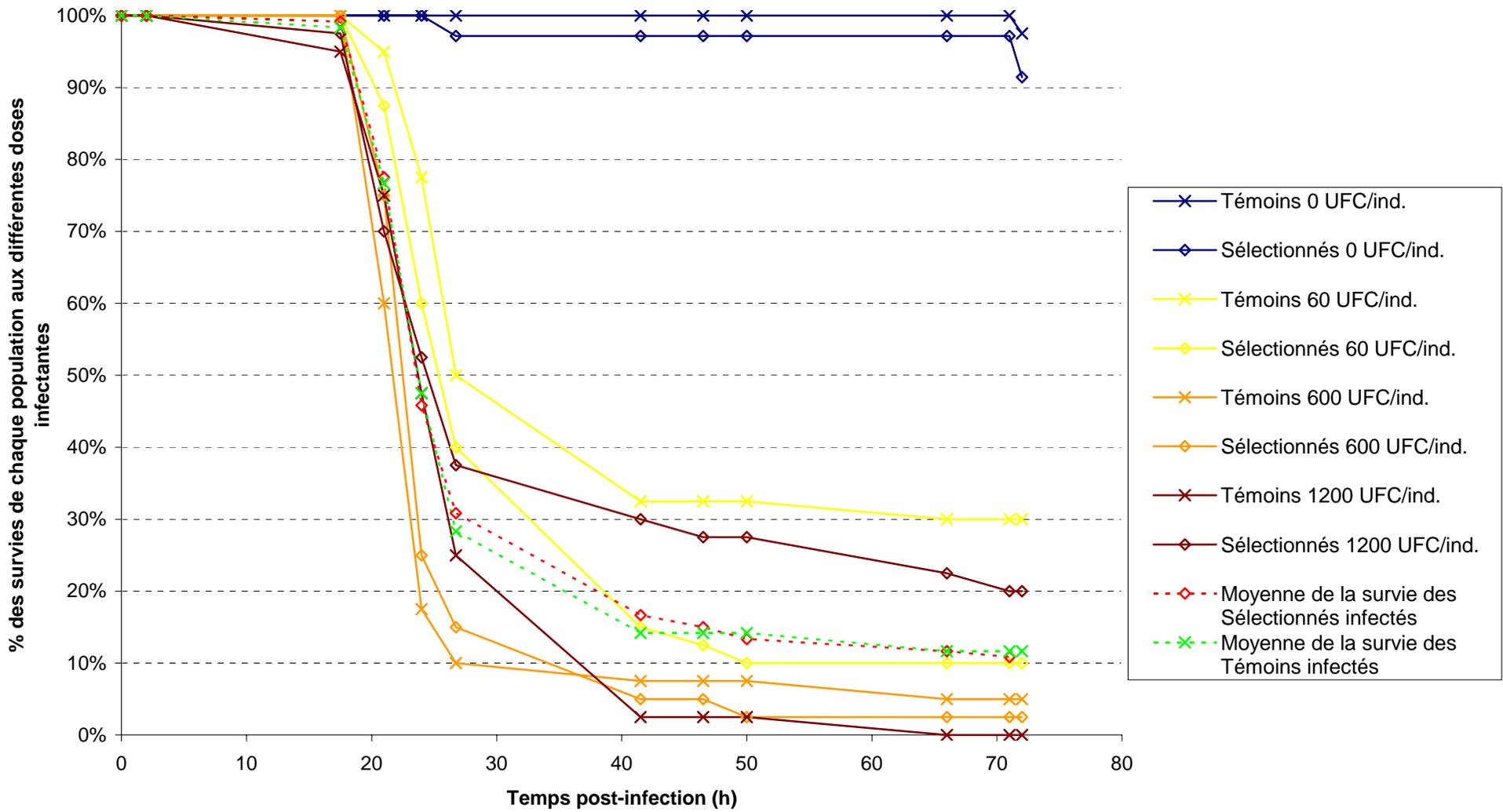
Suivis des mortalités de l'injection n°4



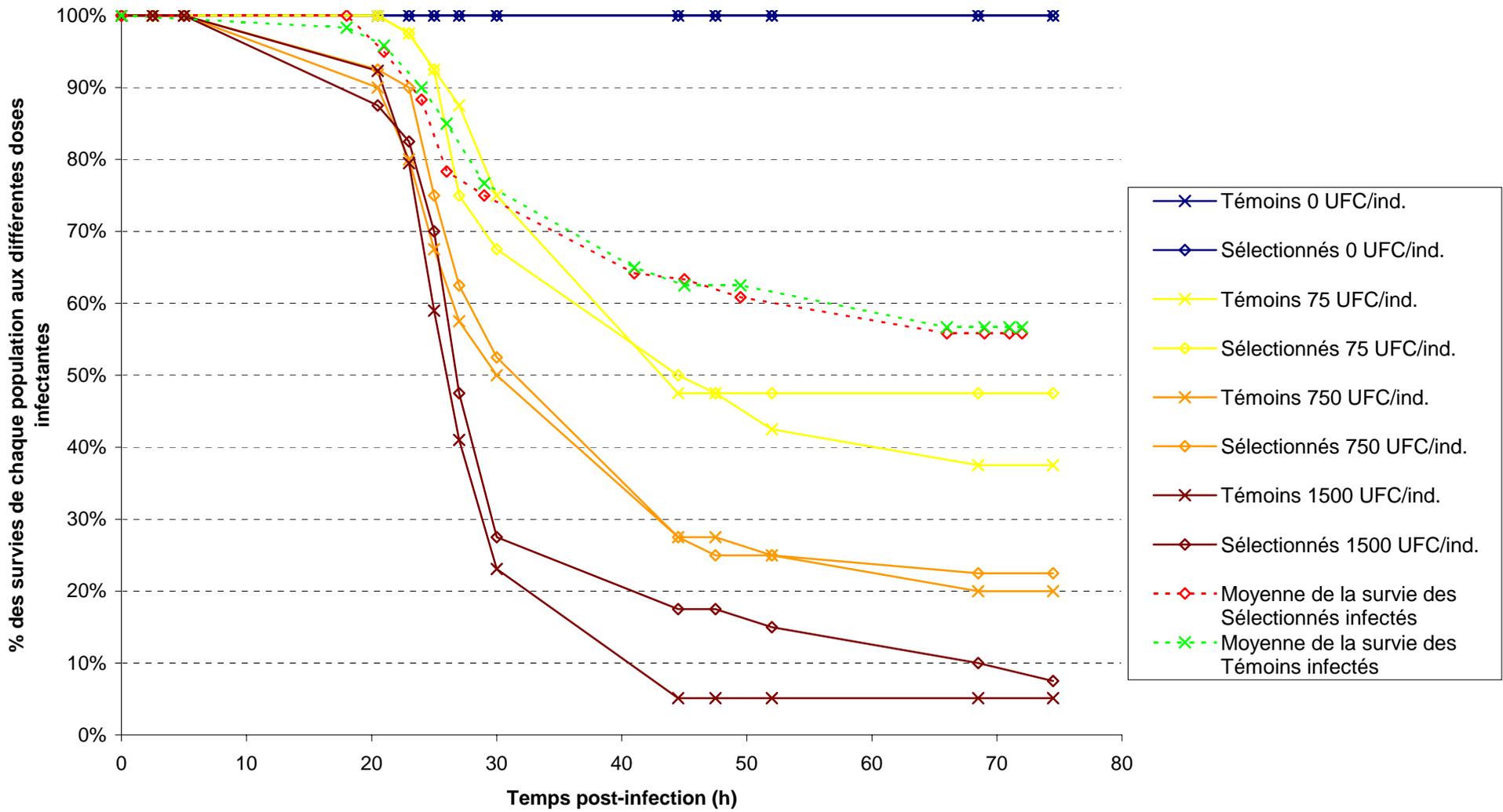
Suivis des mortalités de l'injection n°5



Suivis des mortalités de l'injection n°6



Suivis des mortalités de l'injection n°7



Annexe 9. Résultats détaillés des ANOVA réalisées sur les données physio-immunologiques d'Avril 2004.

- Résultats des ANOVA mesurant l'effet des facteurs « séries de prélèvement », « population » et de l'interaction de ceux-ci sur les indicateurs physio-immunologiques mesurés.

<i>Effet de → sur ↓</i>	Séries de prélèvement (T1, T2, T3)	Population (S, T)	Série × Population
THC	p<0,0001	P=0,3452	p=0,6426
CO	p<0,0001	P=0,1882	p=0,2414
[hémoc]	p<0,0001	P=0,9372	p=0,8840
[prot]	p<0,0001	P=0,7941	p=0,1585
[Mg]	p<0,0001	P=0,3677	p=0,4770
[Ca]	p<0,0001	P=0,6285	p=0,3917
[glu]	p=0,2391	P=0,1342	p=0,6013
[lac]	p<0,0001	P=0,0630	p=0,9453

- Résultats des tests de Fisher comparant les « séries de prélèvement » T1, T2 et T3 entre elles pour les indicateurs physio-immunologiques mesurés.

THC (nbre de cellules par mL d'hémolymphe) :				
	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-22766137,567	4908880,490	<,0001	S
T1, T3	860937,786	5013559,225	,7351	
T2, T3	23627075,352	5013559,225	<,0001	S

CO corrigé de l'effet « poids » (mmol/kg) :				
	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	26,275	10,175	<,0001	S
T1, T3	-5,226	10,426	,3240	
T2, T3	-31,500	10,348	<,0001	S

[hémoc] corrigé de l'effet « poids » (mmol/L) :				
	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-,426	,093	<,0001	S
T1, T3	-,284	,095	<,0001	S
T2, T3	,142	,095	,0037	S

[prot] (mg/mL) :				
	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-25,100	8,760	<,0001	S
T1, T3	-21,760	9,128	<,0001	S
T2, T3	3,340	9,166	,4727	

[mg] corrigé de l'effet « poids » (mmol/L):

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-1,322	,712	,0003	S
T1, T3	-2,633	,742	<,0001	S
T2, T3	-1,311	,745	,0007	S

[ca] (mmol/L) :

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-3,844	1,036	<,0001	S
T1, T3	-3,980	1,080	<,0001	S
T2, T3	-,136	1,084	,8051	

[glu] (mg/dL) :

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-2,659	3,115	,0938	
T1, T3	-1,489	3,259	,3685	
T2, T3	1,170	3,259	,4794	

[lac] (mg/dL) :

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
T1, T2	-5,742	1,846	<,0001	S
T1, T3	-4,015	1,908	<,0001	S
T2, T3	1,727	1,923	,0780	