

Station d'Aquaculture de Saint-Vincent

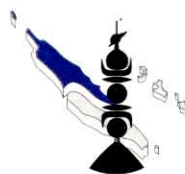
IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLAIE



Nouvelle-Calédonie



et le GIE Recherche Aquacole



PROVINCE NORD



PROVINCE SUD

STATION D'AQUACULTURE DE SAINT-VINCENT

Contrat Cadre "Crevettes" n° 93/1211779/YP
Contrat "Pathologie crevettes" n°96/1212627
Contrat "Pathologie crevettes" n°96/1212568

Typage moléculaire en AP-PCR des souches de *Vibrio spp.* isolées des épisodes de mortalité du Syndrome 93. Perspectives de lutte et conseils de gestion zoosanitaires déduits.

Rédacteur : Cyrille GOARANT

Type de rapport et n°:

RAPPORT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

97.01

Résumé :

Une étude de typage moléculaire par AP-PCR de souches de *Vibrio* impliqués dans des épisodes de mortalité d'élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie (Syndrome 93) et au Japon a été réalisée fin 1996 avec le concours de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Elle nous a permis une identification rapide des isolats en terme de géospecies ainsi que des discriminations d'intérêt épidémiologique entre les isolats du géospecies majoritaire. Ainsi, des sous-groupes ont été identifiés au sein de l'espèce majoritaire : *V. penaeicida*. Certains de ces sous-groupes correspondent à des topotypes et permettent de discriminer les isolats du Japon de ceux de Nouvelle-Calédonie, ainsi que ceux de deux baies différentes de Nouvelle-Calédonie, distinctes de 50 km seulement. D'autres sous-groupes ont pu être identifiés au sein de l'un des topotypes calédoniens, sans qu'il soit possible de l'expliquer par des éléments épidémiologiques. L'analyse des géotypes et des données zootechniques permettent de qualifier cette vibriose de maladie hydrique, c'est à dire dont le pathogène est véhiculé par l'eau. Des recommandations d'ordre zoosanitaires en sont déduites, qui tendent principalement à limiter les transferts d'animaux entre les différents sites d'élevage. Cette technique d'AP-PCR est utilisée pour la première fois dans l'étude épidémiologique d'une vibriose de crevettes. Sa rapidité, sa fiabilité et les informations d'ordre épidémiologique qu'elle fournit en font une technique de choix pour ce type d'étude.

INTRODUCTION

Le Syndrome 93 est une pathologie qui, depuis 1993, affecte les élevages de crevettes du Territoire au cours de la phase de grossissement en bassins. Son expression est principalement marquée, sous forme de flambées épizootiques brèves, à l'entrée et à la sortie de la saison froide, ou de façon plus chronique le reste du temps. Les facteurs de risques déjà connus sont les variations rapides de température (principalement à la baisse), les baisses de niveau pour pêche partielle. Les pics de mue aggravent souvent la sévérité des épisodes morbides. Le tableau histologique est celui d'une vibriose septicémique classique, ainsi que la présence dans de nombreux organes de corpuscules basophiles évoquant l'intervention d'un virus ou de facteurs toxiques ou toxiniques. Les derniers travaux d'infections expérimentales réalisés à l'Université d'Arizona dans l'équipe du Dr Lightner (Garza, J. com. pers.) montrent que les souches pathogènes de *Vibrio* isolés au cours de pics de mortalité du Syndrome 93 reproduisent, sur des animaux présumés SPF, l'ensemble du tableau anatomo-pathologique, corpuscules basophiles compris. Ces travaux confirment les résultats obtenus sur les crevettes SPR 43 du COP à Tahiti en 1995. Cette observation remet fortement en cause l'hypothèse d'une intervention virale dans la pathogénie du Syndrome 93.

Dans le cadre des travaux sur les souches bactériennes isolées de pics de mortalité, une étude de typage moléculaire a été entreprise en collaboration avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, par la technique d'AP-PCR. Cette étude avait pour objectifs :

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

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

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

MATERIEL ET METHODES

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

* Quatre souches de référence choisies sur la base des travaux précédents (ribotypes et hybridations ADN / ADN à l'Institut Pasteur de Paris, biotypes au LTDV / CIRAD). Ces quatre espèces sont : *Vibrio penaeicida* ; *V. nigripulchritudo* ; *V. alginolyticus* et *V. harveyi*.

* Quatre souches de *Vibrio penaeicida* Japonais isolés de *Penaeus japonicus* lors d'épisodes de vibriose dans cette espèce au Japon ont également été incluses.

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

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

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

* Enfin une sélection de souches issues de prélèvements monomorphes sur des animaux moribonds au cours de pics de mortalité de la saison froide 1995 sur 4 fermes du Territoire constituaient la plus grande part des souches étudiées. Ces souches sont listées dans le tableau ci-dessous, précisant leur origine (ferme et date de l'épisode de mortalité). L'origine des postlarves ayant servi à ensemercer les bassins où ont eu lieu ces épisodes de mortalité y est également précisée. La localisation géographique des fermes et écloséries citées dans ce tableau ou dans le texte est précisée sur la carte en annexe 1.

tableau 1 : Origine (ferme, bassin et date de prélèvement) des souches isolées lors d'épisodes de mortalité du Syndrome 93 au cours de la saison fraîche 1995, et origine des postlarves ayant servi à l'ensemencement de ces bassins.

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

Les ADN ont été extraits au phénol-chloroforme selon la technique décrite par Brenner *et al.* (1982), ainsi qu'avec une technique plus rapide décrite par Boom *et al.* (1990). La technique de typage utilisée est celle de l'AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, Welsh et McClelland, 1990) qui permet, à l'aide d'amorces arbitraires, de générer des profils électrophorétiques (voir annexe 2) qui peuvent être utilisés pour comparer les micro-organismes au niveau de l'espèce ou au sein de la même espèce. Cette technique et d'autres techniques d'amplification arbitraires proches ont été utilisées avec succès dans l'étude de nombreuses espèces et souches bactériennes (Williams *et al.*, 1990 ; Pérolat *et al.* 1994), y compris sur des germes du genre *Vibrio* (Aznar *et al.*, 1993 ; Martinez *et al.* 1994). Elle présente en outre les avantages de ne pas nécessiter de connaissance préalable des séquences génomiques de l'organisme à étudier, et d'être relativement rapide et légère.

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

Sept de ces amorces arbitraires ont été testées dans un premier temps (à froid) KF, KN, RSP, KZ, KpnR, KG et SP.

RESULTATS

SELECTION DES AMORCES :

Trois amorces ont été conservées pour l'étude à chaud : RSP et SP du fait des profils électrophorétiques riches qu'ils génèrent, présageant un fort caractère discriminant et KF qui permettait, déjà lors des électrophorèses à froid, de différencier des sous-groupes au sein de l'espèce *Vibrio penaeicida*.

IDENTIFICATION DES ESPECES BACTERIENNES

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

- * trois isolats : AQ 114, W 9 et W 1 n'ont pas été identifiés,
- * trois isolats : AQ 61, AQ 66 et SF 5 correspondent à *V. alginolyticus*,
- * deux isolats : AQ 113 et W 11 correspondent à *V. harveyi*,
- * sept isolats : AM 102, AM 109, AM 114, AM 115, SO 27, SO 38 ET SO 65 correspondent à *V. nigripulchritudo*,
- * enfin, les 42 autres isolats correspondent à *V. penaeicida*.

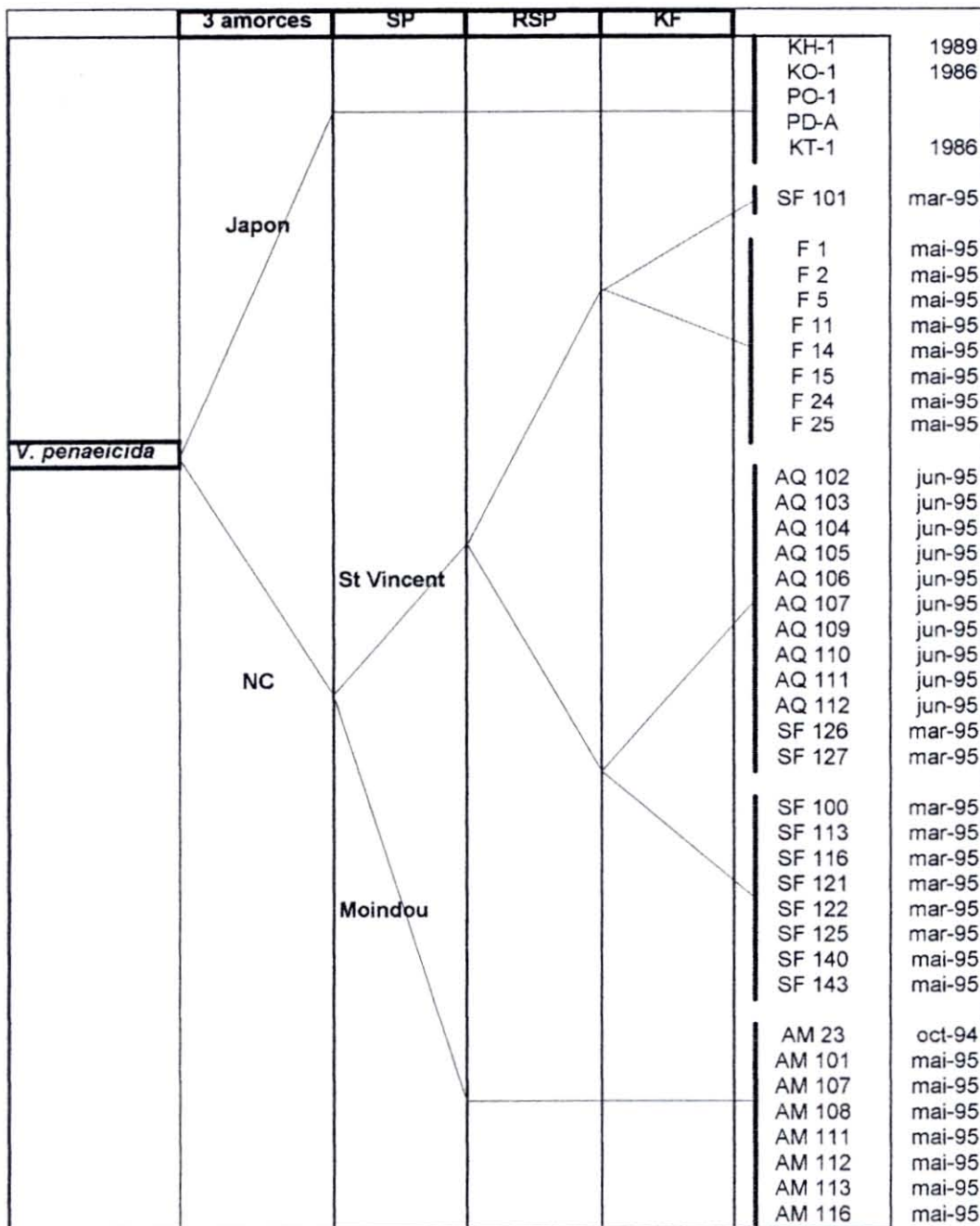
RESULTATS D'INTERET EPIDEMIOLOGIQUE ET DISCUSSION

* Les *V. penaeicida* Japonais peuvent être différenciés des Néo-calédoniens avec chacune des trois amorces. Ces différences portent sur des fragments nombreux et stables entre les différents isolats de chacun des deux groupes nationaux. Ceci ne permet pas de prouver formellement que les *Vibrio penaeicida* de Nouvelle-Calédonie ne proviennent pas d'une importation, mais rendent cette hypothèse peu probable.

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

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

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



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

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

* La distinction de deux sous-groupes géographiques correspondant d'une part aux isolats de la ferme Aquamer (groupe « Moindou »), d'autre part aux isolats des trois autres fermes, toutes trois situées en baie de Saint-Vincent (groupe « Saint-Vincent ») (voir annexe 2).

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

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

* L'origine des postlarves des bassins ensemencés (voir plus haut, Matériel et méthodes) prouve que ces postlarves ne sont pas à l'origine de la contamination des bassins (Sea Farm et FAO : postlarves de l'écloserie de Montagnès, Aquamer et Aquamon : postlarves de l'écloserie de Mara). Il apparaît donc que la source commune de contamination par *Vibrio penaeicida* est très vraisemblablement l'eau de pompage.

CONCLUSIONS

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

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

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

Enfin, concernant *V. penaeicida*, les travaux japonais (De la Peña *et al.*, 1995) confirmés par les travaux du COP sur les souches calédoniennes (Ansquer, com. pers.) montrent une survie de *V. penaeicida* en eau de mer très longue (supérieure à 12 mois pour les travaux japonais, au moins égale à 4 mois pour les travaux du COP)... Cette conclusion, ainsi que celles de cette étude font de la vibriose à *V. penaeicida* une pathologie contagieuse véhiculée par l'eau, et installée de façon enzootique sur les sites où se trouve le pathogène. Les moyens de lutte apparaissent dès lors limités :

* l'aboutissement du travail d'écopathologie pourrait déboucher sur des recommandations de modifications zootechniques apportant une diminution de l'expression de la maladie ;

* la sélection de lignées à résistance génétique accrue à la pathologie constituerait également une approche intéressante.

Il est intéressant de rapprocher le caractère saisonnier du Syndrome 93 de celui observé (De la Peña *et al.* 1992) dans la vibriose à *V. penaeicida* chez *Penaeus japonicus* (voir annexe 3).

PERSPECTIVES

* Le travail mené ici peut être la première étape vers la constitution de sondes nucléiques spécifiques (Letocart *et al.* 1997), utilisables comme outils diagnostiques, ou dans le cadre d'une étude épidémiologique de plus grande ampleur.

* Du fait du rôle majeur de *V. penaeicida* dans le Syndrome 93 démontré dans cette étude, il apparaît intéressant d'étudier les facteurs de virulence de ces souches. De plus, les pouvoirs pathogènes expérimentaux très proches de *V. penaeicida* et de *V. nigripulchritudo* évoquent la possibilité de la présence de plasmides, supports de cette virulence. Une collaboration avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie est en cours de préparation pour établir un programme de travail sur ce sujet.

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

Remerciements

A l'IPNC qui m'a accueilli et encadré avec beaucoup de gentillesse et de compétences.

A la SASV, qui a du parfois s'organiser pour pallier mon absence pendant 2 mois.

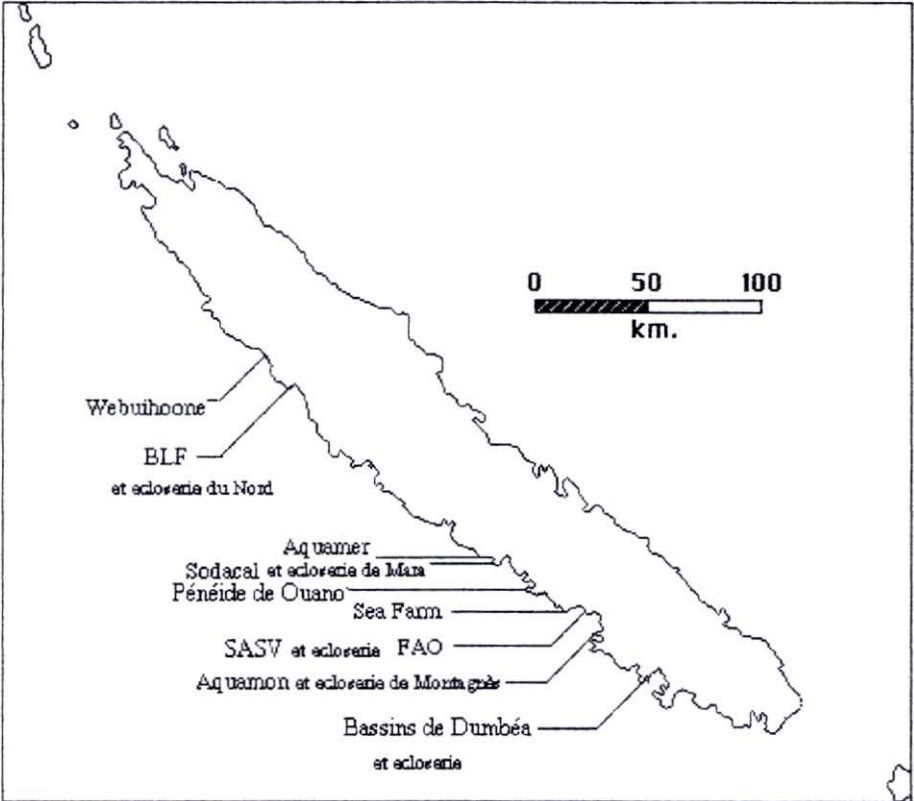
A Vincent Pomarède, qui a, sans faillir, réalisé la partie « ingrate » du travail (l'extraction des ADN).

Au LTDV et au CIRAD, qui ont effectué une grande partie du travail amont de récolte et de conservation des souches.

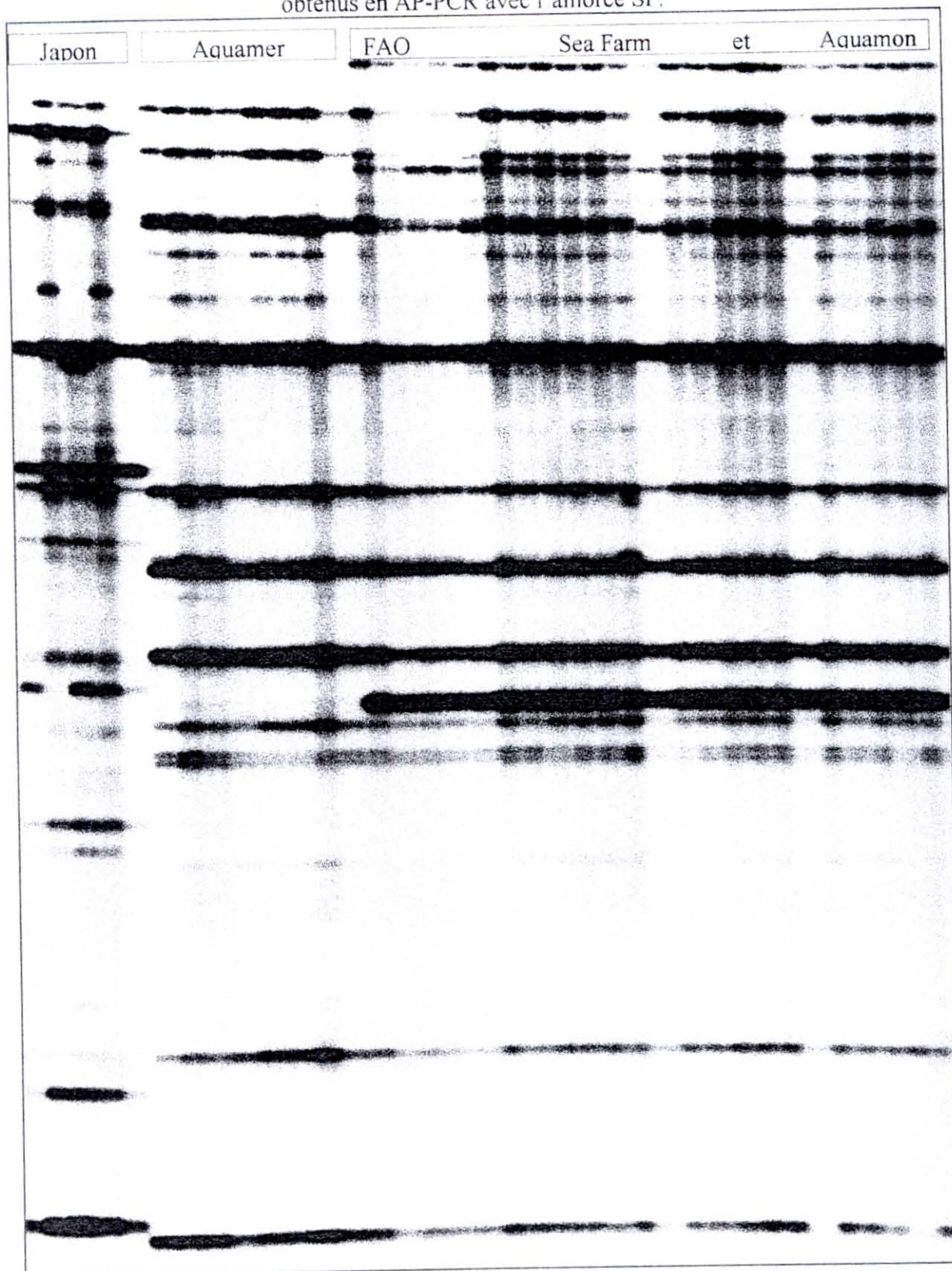
Au Professeur Muroga, qui a fourni gracieusement les souches de *V. penaeicida* Japonais.

Aux Provinces Nord et Sud qui financent ce programme de recherche sur le Syndrome 93.

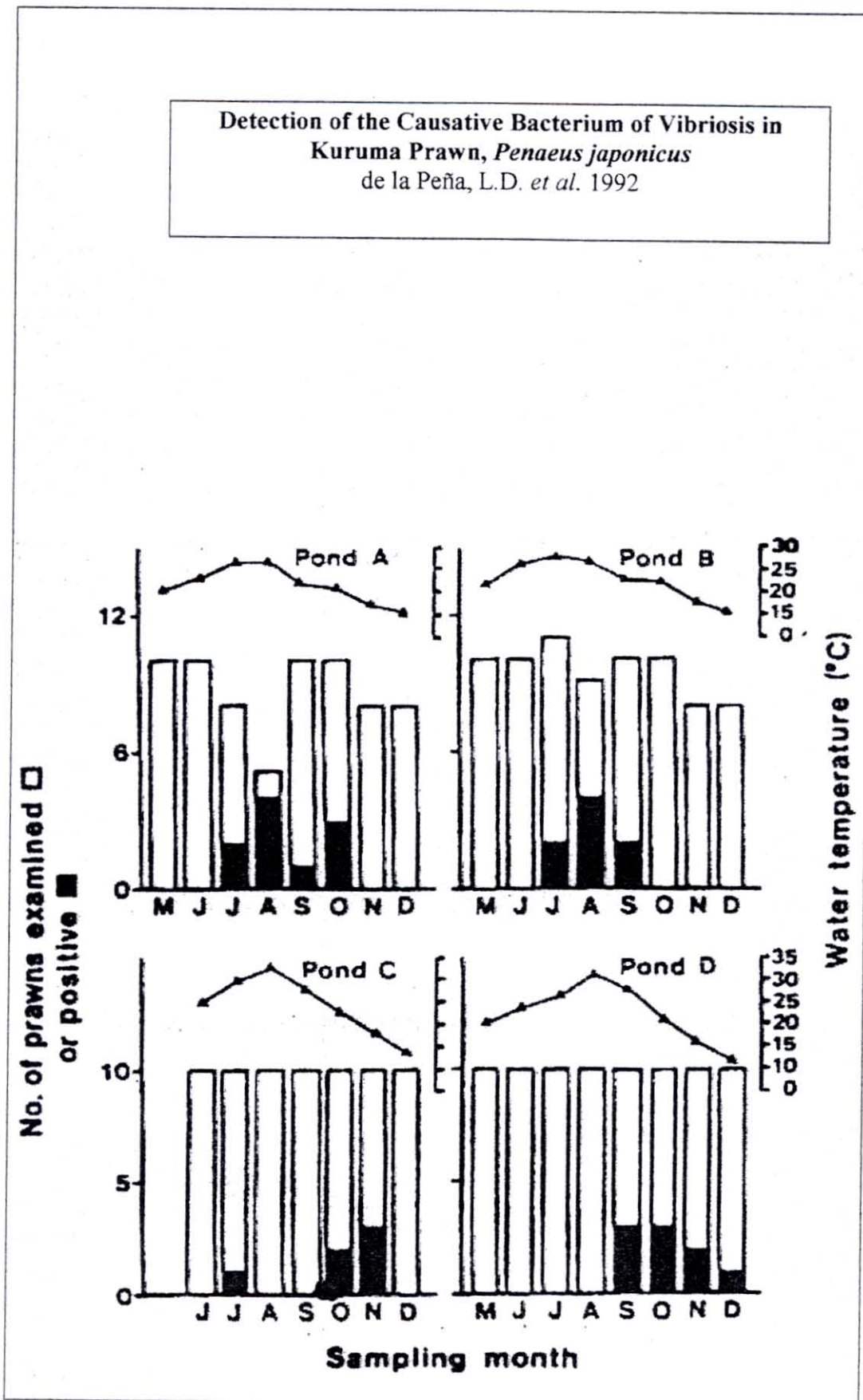
Annexe 1 : Localisation géographique des fermes et ecloseries citées dans le rapport.



Annexe 2 : profils électrophorétiques des isolats de l'espèce *V. penaeicida* obtenus en AP-PCR avec l'amorce SP.



Annexe 3 : Caractère saisonnier de la vibriose à *Vibrio penaeicida* chez *Penaeus japonicus*.



BIBLIOGRAPHIE :

1. Aznar, R. ; Ludwig, W ; Schleifer, K-H. 1993. Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. System. Appl. Microbiol. 16: 303-309.
2. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.
3. Brenner, D.J., A.C. McWhorter, J.K. Leete Knuston, and A.G. Steigerwalt. 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. J. Clin. Microbiol. 15: 1133-1140.
4. De La Peña, L.D. ; Momomaya, K. ; Nakai, T. ; Muroga, K. 1992. Detection of the causative agent of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Fish Pathol.-Gyobyo Kenkyu 244: 223-228
5. De la Peña, L.D. ; Tamaki, T. ; Momoyama, K. ; Nakai, T. ; Muroga, K. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 115: 1-12.
6. Martinez, I. ; Espelid, S. ; Johansen, A. ; Welsh, J. ; McClelland 1994. Fast identification of species and strains of *Vibrio* by amplification of polymorphic DNA. J. Fish Diseases, 17: 297-302.
7. Pérolat, P. ; Mérien, F. ; Ellis, W.A. ; Baranton, G 1994 : Characterization of *Leptospira* Isolates from Serovar Hardjo by Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Mapped Restriction Site Polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology 32(8): 1949-1957
8. Takahashi Y., Y. Shimomaya and K. Momomaya. 1985. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate. Bull. of Jap. Soc. Sci Fish. 51: 721-730.
9. Welsh, J. ; McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218.
10. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.