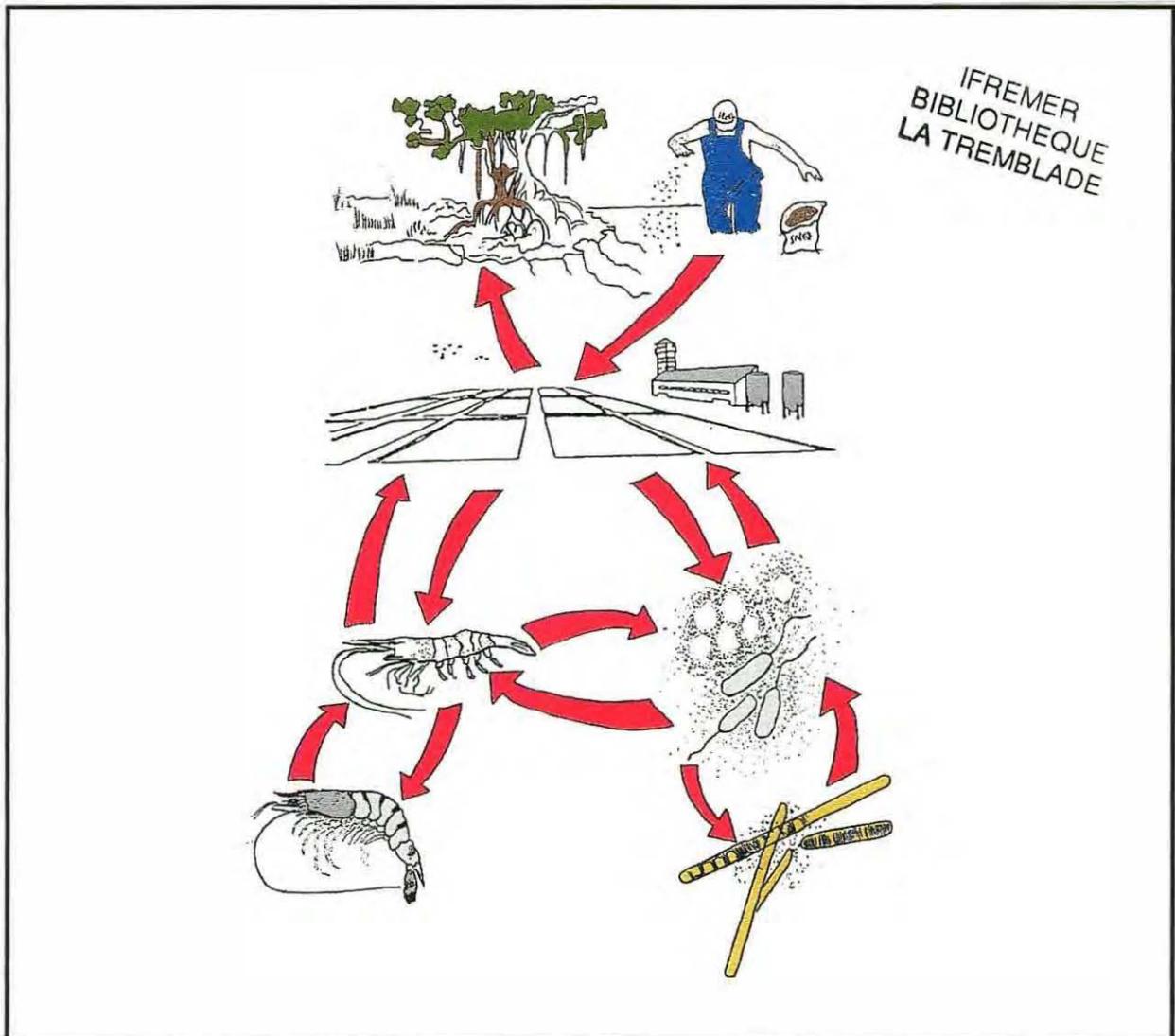


Rapport sur la pathologie des pénéides en Nouvelle-Calédonie

état et perspectives du programme d'assistance
à la filière crevette de Nouvelle-Calédonie
par la recherche en pathologie



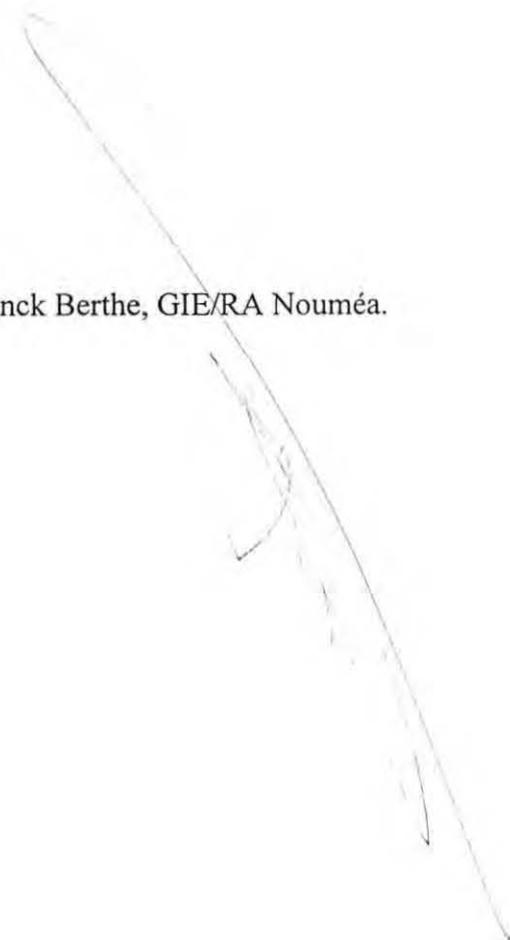
rapport d'activité du 01 09 1994 au 31 03 1995,
par Franck Berthe, GIE/RA Nouméa.

Rapport sur la pathologie des pénéides en Nouvelle-Calédonie

état et perspectives du programme d'assistance
à la filière crevette de Nouvelle-Calédonie
par la recherche en pathologie

rapport d'activité du 01 09 1994 au 31 03 1995

par Franck Berthe, GIE/RA Nouméa.



Remerciements

ce document n'aurait pu voir le jour sans les efforts conjugués de plusieurs équipes, notamment du LTDV, du CIRAD Païta, du service de Pharmacologie de l'ORSTOM Nouméa, de l'Unité des Entérobactéries de l'Institut Pasteur de Paris, de l'IFREMER COP et URPIG, du GIE-RA Nouméa et de la SASV.

*J'aye seulement fait un amas
de fleurs estrangières, n'y ayant
fourni du mien que le filet à les lier.*

Montaigne

Plan :

introduction générale

1^{ère} partie : Situation de la question

- 1-1 : images de la pénéculture en Nouvelle-Calédonie
 - 1-1-1 : données générales
 - 1-1-2 : perspectives de développement de la filière
 - 1-1-3 : une petite histoire du syndrome 93
- 1-2 : approche des maladies en aquaculture
 - 1-2-1 : généralités sur la pathologie en aquaculture
 - 1-2-2 : les maladies connues de *Penaeus stylirostris*
 - 1-2-3 : quelques expériences en la matière
 - 1-2-4 : vers un concept de pathologie intégrée

2^{ème} partie : Le programme de recherche en pathologie

- 2-1 : le programme dans sa formulation initiale
 - 2-1-1 : contexte de son établissement
 - 2-1-2 : Le programme de recherche en pathologie
 - 2-1-3 : commentaires et financement
- 2-2 : discussion des acquis - modulation
 - 2-2-1 : diagnostic de l'agent étiologique
 - 2-2-2 : identification des conditions favorisantes

3^{ème} partie : Etiologie du syndrome 93

- 3-1 : données histologiques
 - 3-1-1 : le stress dans le déclenchement de mortalité
 - 3-1-2 : histologie des prélèvements faits sur les fermes
- 3-2 : étude bactériologique
 - 3-2-1 : communautés bactériennes des environnements marins littoraux
 - 3-2-2 : les *Vibrio*
 - 3-2-3 : étude bactériologique du syndrome 93
- 3-3 : statut des animaux élevés vis-à-vis du IHHNV
 - 3-3-1 : le virus IHHN : répartition, espèces cibles, conséquences
 - 3-3-2 : méthodes de diagnostic
 - 3-3-3 : résultats
- 3-4 : pathologie expérimentale

4^{ème} partie : La question des traitements

4-1 : généralités sur les médicaments vétérinaires

4-2 : les antibiotiques

4-2-1 : généralités sur l'OTC

4-2-2 : approche expérimentale

4-2-3 : résultats

4-2-4 : discussion

5^{ème} partie : Perspectives

5-1 : expériences réalisées par les diverses équipes scientifiques impliquées

5-1-1 : actions menées par la SASV

5-1-2 : actions menées par le LTDV

5-1-3 : actions menées par le COP

5-1-4 : autres intervenants, URPIG, ORSTOM, Institut Pasteur

5-2 : note relative à l'organisation du programme

Liste des sigles et abréviations

Nomenclature des échantillons et prélèvements

Bibliographie

Glossaire des termes employés

Annexes :

1 - appendices techniques du programme

2 - matériel et méthodes relatifs aux expériences sur l'OTC

3 - tests recommandés dans le cadre de l'étude bactériologique des souches de *Vibrio spp.*, isolées en Nouvelle-Calédonie

introduction générale

La pénéculture calédonienne connaît, depuis 1993, de sévères difficultés de développement et son expansion, spectaculaire au cours des six dernières années, est aujourd'hui considérablement ralentie. Le «syndrome 93», terme consacré par l'usage, affecte les élevages dans leur phase dite de grossissement, et se traduit par des taux de survie inférieurs aux seuils de rentabilité des fermes. Les pertes infligées à la filière mettent celle-ci en péril. C'est pourquoi un programme d'assistance par la recherche en pathologie des pénéides a été élaboré afin de répondre à ces difficultés.

Le but de cette démarche est d'établir un plan de lutte basé sur la détection précoce de situations critiques, caractérisées par la présence d'un agent pathogène (diagnostic) et concomitantes à la mise en jeu de facteurs de risques (conditions favorisantes).

Ce programme mis en place et géré par le GIE/RA est financé conjointement par le Territoire de Nouvelle-Calédonie, la Province Sud et la Province Nord. Il développe un grand nombre de collaborations entre diverses équipes scientifiques, tant sur le Territoire qu'en Métropole.

Après six mois d'exercice, la première phase de la démarche diagnostique arrive à son terme : l'identification de différents agents pathogènes impliqués dans le syndrome 93, dont il importe aujourd'hui de préciser le rôle étiologique. Des enquêtes zootechniques, en cours d'analyse, devraient permettre de formuler des hypothèses quant aux facteurs de risque de ce phénomène. Cet ensemble, on le voit, tend vers une gestion rationnelle du système d'élevage en présence de pathogènes potentiels.

Le présent rapport voudrait rassembler les connaissances acquises depuis plusieurs mois sur la pathologie des pénéides en Nouvelle-Calédonie. Parce que rassembler est une traduction étymologique de comprendre, il nous a semblé que ce travail pouvait être utile. Il s'agit donc dans ce qui suit de trouver les éléments d'une réflexion plutôt que les conclusions d'une étude...qui en est encore à ses premiers pas.

1ère partie : Situation de la question

L'IFREMER a initié, en 1973, un programme de recherche sur l'élevage des pénéides en Nouvelle-Calédonie. Ce programme mené à la Station d'Aquaculture de Saint Vincent, devait aboutir au choix d'une espèce pour une production à échelle commerciale. Le choix s'est porté sur *Penaeus stylirostris* qui s'est avérée l'espèce la mieux adaptée aux conditions d'élevage particulières de la Nouvelle-Calédonie. Deux fermes commerciales voyaient le jour dès 1984 (SODACAL et AQUAMON). La production de crevettes d'élevage a connu, depuis, une période de forte croissance. Cette croissance est le résultat de l'effet conjugué d'une augmentation de la surface de bassins exploitée, mais aussi de l'amélioration des techniques d'élevage. Aujourd'hui sept fermes (en dehors de la SASV) assurent une production de l'ordre de 690 tonnes par année et plusieurs projets sont en cours d'étude, ou de réalisation. L'élevage de crevettes repose bien entendu, et avant tout, sur une maîtrise parfaite des techniques de production. C'est à cette maîtrise que continue de travailler la Station de Saint Vincent.

La production totale de crevettes en Nouvelle-Calédonie a sensiblement diminué en 1993, et ce malgré une augmentation de la surface de bassins (passée de 200 à 247 ha en 1992). En 1994, la production a été de 691,425 tonnes alors que les prévisions laissaient présager 1000 à 1050 tonnes pour les plus optimistes (anonyme, (c) 1994). Les taux de survie anormalement faibles obtenus au cours de la période de grossissement sont à l'origine de cette baisse de production ; le phénomène a pris le nom de "syndrome 93". Pourtant, les caractéristiques géographiques de l'île sont particulièrement prédisposées à l'élevage de la crevette. A ce facteur naturel, il faut ajouter une réelle volonté politique de développement et d'accompagnement financier des projets d'investissement. Cet ensemble contribue à dresser un tableau de perspectives plutôt favorables pour la filière.

I-1 : Images de la pénéculture en Nouvelle-Calédonie

I-1-1 : données générales sur la filière

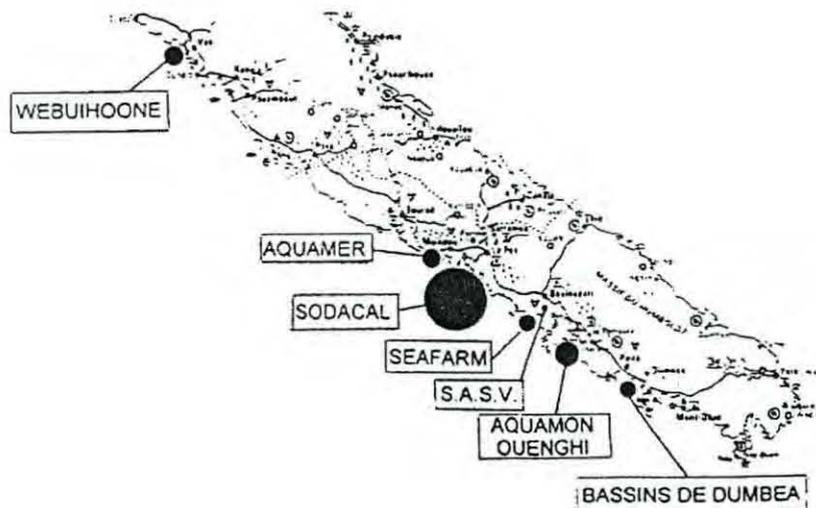


figure n° 1

situation et surfaces des bassins en exploitation au 01 Janvier 1994.

La plupart des fermes se situent en Province Sud, à l'exception de la ferme de Webuihoone (commune de Voh), première installation en Province Nord. La surface totale de bassins en 1994 était de 321 hectares, implantés pour leur ensemble sur la façade Sud-Ouest de l'île (cf figure n° 1).

L'évolution de la production depuis 1988 est donnée par la figure n° 2. L'augmentation au cours des six dernières années de cette production est le résultat de deux phénomènes qui sont notamment l'augmentation de la surface de bassins exploitée, et l'amélioration des protocoles zootechniques. Cette augmentation globale relève cependant de situations diverses en fonction des sites. Si l'on se réfère aux données chiffrées des deux dernières années de production (1993/1994), la production des bassins de Dumbéa est en hausse, passant de 24 à 39 tonnes (soit environ le niveau de cette ferme en 1991) ; la situation de SODACAL peut être considérée comme stationnaire, stabilisée depuis deux ans à un niveau de production de l'ordre de 243 tonnes. Enfin, la ferme d'Aquamon a produit, en 1994, 113 tonnes contre 146 en 1993 (et 201 en 1992). Cette diversité de situations met en lumière la difficulté de raisonner de façon globale sur la filière.

Au cours de ces dernières années, de même que la production globale augmentait, la productivité des sites a connu un fort accroissement passant de 1,41 tonne par hectare et par an en 1989, à 3,03 t/ha/an en 1992. Il est donc possible de dire que ces dernières années ont été marquées par une augmentation de la production et une intensification du système de production. Toutefois, là encore, les situations des fermes peuvent difficilement être fondées en un seul et unique chiffre. Les choix techniques faits lors de la conception des fermes conduisent aujourd'hui à des rendements pouvant varier entre 1,9 et 4,23 t/ha/an.

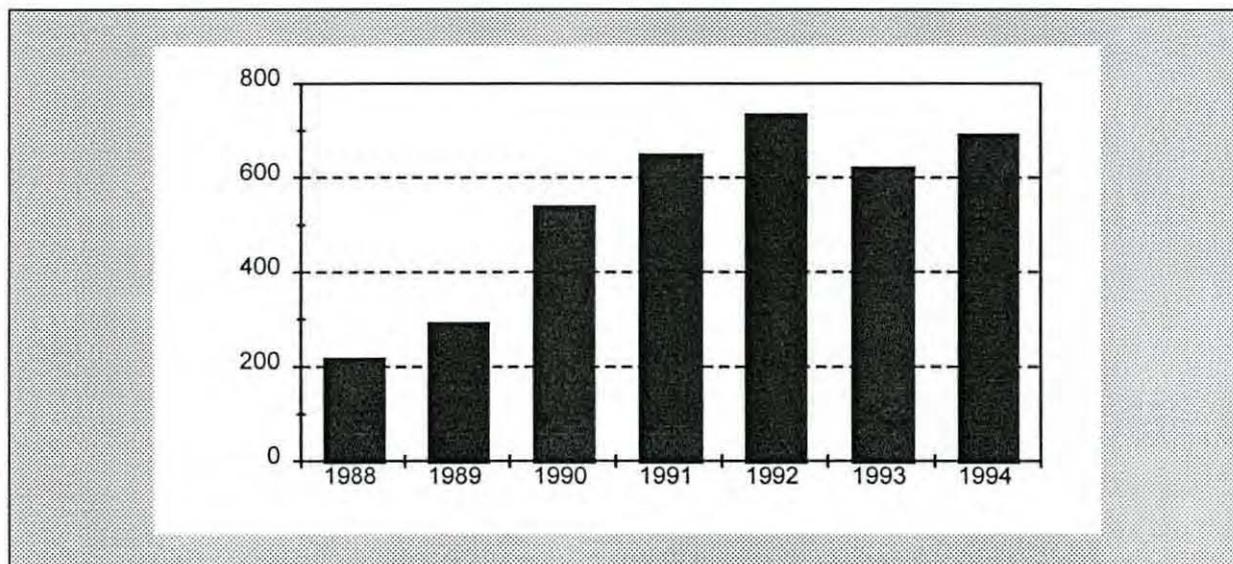


figure n° 2 : évolution de la production de pénéides d'élevage en Nouvelle-Calédonie exprimée en tonnes.

Il nous paraissait important de souligner ici la diversité des fermes quant à leur âge, leur conception technique, leur productivité et leur gestion. Cette diversité, on le comprend aisément, rend difficile l'analyse des conditions d'apparition du syndrome 93. Cependant, il nous faut garder en mémoire le mouvement général de la filière au cours des dernières années de croissance et d'intensification.

I-1-2 : perspectives de développement de la filière

Les chiffres annoncés (anonyme, (c) 1994) font état d'une production prévisionnelle de 1000 à 1050 tonnes pour l'année 1994 avec la perspective de 2000 tonnes en 1997. Force est de constater que le syndrome 93, identifié alors comme une difficulté d'ordre conjoncturelle, n'a pas permis la réalisation de tels objectifs de production.

En termes de production globale, il est possible de penser à un maintien et même une légère augmentation de celle-ci, du fait essentiellement de nouveaux projets d'exploitation. Ces projets (pénéides de Ouano, Blue Lagoon Farm) en sont aujourd'hui à des états d'avancement variés. Les premiers bassins des pénéides de Ouano ont été mis en eau courant Mars 1995 alors que le projet Blue Lagoon Farm est en cours de financement.

De plus, les sites susceptibles d'être valorisés sont nombreux. Une étude menée dans le cadre du projet ALIAS fait état de 1 200 hectares de sites favorables en Province Nord. Ce type d'étude a conduit à avancer les chiffres de 2 500 tonnes pour la Province Sud et 3 500 tonnes pour la Province Nord : ces chiffres représentent la production optimale de ces régions sur la base d'un rendement annuel moyen de 5 t/ha/an.

Ces prévisions sont particulièrement optimistes puisqu'elles supposent une exploitation systématique des sites propices, des rendements théoriques jamais atteints, etc... Il n'en reste pas moins vrai que la Nouvelle-Calédonie présente un fort potentiel de production de crevette d'élevage. Cette notion est de première importance à nos yeux.

I-1-3 : une petite histoire du syndrome 93

Un syndrome est un ensemble de signes, de symptômes, qui appartiennent à une même entité clinique mais dont les causes peuvent être diverses. Le syndrome 93 pourrait donc trouver sa définition dans l'ensemble des manifestations anormales observées depuis le second trimestre 1993 en élevage de crevettes pénéides ; il serait cependant plus exact de parler de complexe pathologique que de syndrome.

La construction du nom d'une maladie répond à des règles précises : nom de l'agent causal, ou de l'organe cible, terminaison en -ite pour les phénomènes inflammatoires, en -ose pour les chroniques. Face à une atteinte systémique, dont l'étiologie nous est encore inconnue, ces constructions ne nous sont pas permises dans l'état actuel de nos connaissances. Le caractère excessivement frustré de la sémiologie en matière de pathologie des invertébrés marins (ici, les individus malades ont une nage anormale, en surface et près des bords, montrent souvent un corps sombre, des appendices et branchies rouge-orangés, quelquefois des taches noires sur la carapace et un tube digestif généralement vide, présentent des temps de coagulation augmentés) rendrait même le terme de syndrome presque abusif. Cependant, qu'importe que l'on ait parlé de la maladie de Boulouparis, du Syndrome de Mortalité des Bassins Calédoniens, de peste de Saint Vincent ou de syndrome 93. Le kala-azar est devenu une leishmaniose, la maladie de Lyme une borréliose, et le Texas Pond Mortality Syndrome, une rickettsiose ; le syndrome 93 changera bientôt, du moins nous pouvons l'espérer, de nom^d.

Nous conserverons le terme de syndrome 93, puisque consacré par l'usage, pour désigner la mortalité anormale qui touche les élevages de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie.

Les premières manifestations de mortalité en grossissement ont été relevées au cours du premier trimestre 1993. Toutefois, il semble qu'alors, il ait été possible de trouver une origine à cette mortalité (anémones toxigènes sur la SASV2, algues toxiques *Heterosigma akashiwo* sur Seafarm). Ces deux épisodes versés au compte d'un « dérèglement du milieu d'élevage » pourraient n'avoir aucun rapport avec le phénomène identifié quelques mois plus tard comme le syndrome 93. Ce dérèglement pouvait cependant révéler alors une plus grande réceptivité des animaux.

Au cours du second trimestre 1993, divers épisodes de mortalité sont notés sur les fermes SASV, Seafarm et Aquamon. Remarquons que ces observations correspondent sur les trois sites à une période comprise entre les 27 et 30 Mai 1993. Un épisode suivra à Aquamon aux environs du 20 Juin. Les observations faites sur les élevages montrent des blooms phytoplanctoniques anormaux ou du moins inhabituels, des troubles du déroulement de la mue des animaux, l'importance d'épicommensaux et d'ectoparasites sur des animaux faibles. Il est noté, en outre, que ces épisodes correspondent à des baisses de température succédant une période déficitaire du point de

^d Il existe un laps de temps - et parfois ce temps est long - entre la nécessité de nommer une entité morbide et la possibilité de le faire scientifiquement. Les noms alors choisis auréolent de mystère la maladie elle-même et le flou qui entoure ces noms ne saurait masquer un certain obscurantisme. Les anglosaxons excellent dans cet exercice de nommer l'innommable : "black gill syndrome", "red disease", "blunted head disease", etc... Même si l'on est loin du vocabulaire fleuri des fièvres malignes catarrhales, du beri-beri ou du kala-azar, l'ignorance est en général derrière ces expressions. C'est ainsi que certaines maladies ont parfois été désignées par des noms différents ; c'est le cas du Texas Pond Mortality Syndrome, de la Necrotizing Hepatopancreatitis et de la Granulomatous Hepatopancreatitis, expressions qui désignent en fait la même entité pathologique.

**Précipitations mensuelles moyennes enregistrées sur la station de Saint Vincent,
la Ouenghi (données Météo France)**

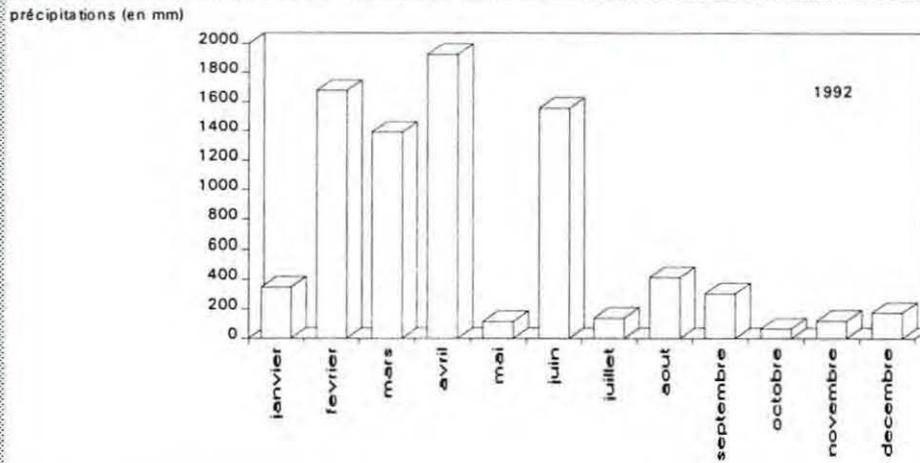


figure n° 3 : précipitations mensuelles moyennes enregistrées sur la station de Saint Vincent pour l'année 1992

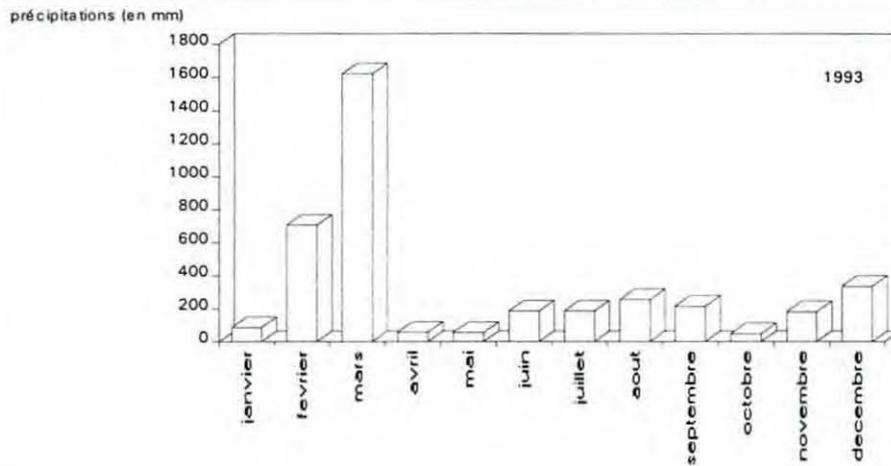


figure n° 4 : précipitations mensuelles moyennes enregistrées sur la station de Saint Vincent pour l'année 1993

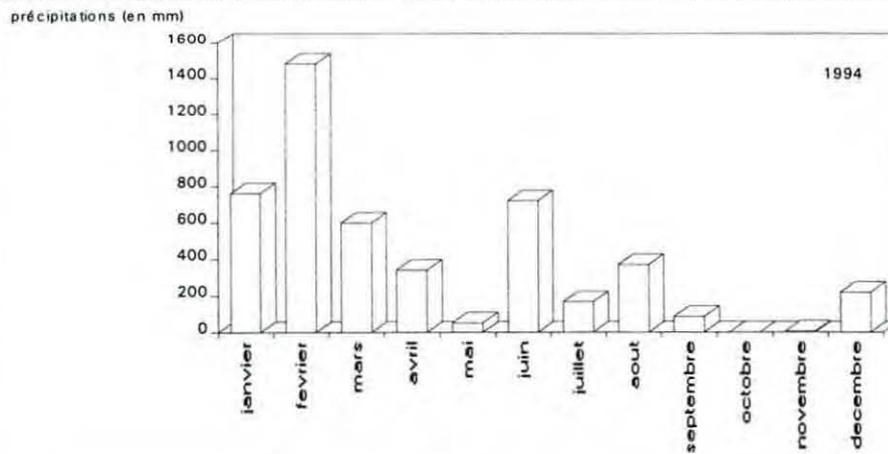


figure n° 5 : précipitations mensuelles moyennes enregistrées sur la station de Saint Vincent pour l'année 1994

vue des précipitations. Les données disponibles de Météo France (cf figures n° 3, 4 et 5) qualifient l'année 1993 d'année de grande sécheresse.

L'expression de la maladie sous forme de flambées épizootiques parfois simultanées sur des sites très éloignés et peu anthropisés a rapidement conduit à éliminer toute hypothèse toxique.

Au cours du troisième trimestre 1993, l'Université de Texas AM diagnostique à partir d'animaux prélevés à Seafarm et Aquamon, des lésions d'entérite hémocytaire. Ces lésions sont classiquement associées à la présence d'algues cyanophycées toxigènes ou parfois de bactéries du genre *Vibrio*. La présence d'algues de type *Trichodesmium erythraeum* (en fait plusieurs espèces du genre *Oscillatoria* et *Spirulina meneghiniana*) est confirmée.

Au cours des derniers mois de 1993, la mortalité passe à un mode d'expression chronique sur les trois fermes SASV, Seafarm et Aquamon, avec parfois quelques manifestations aiguës, notamment fin Septembre, début Octobre.

Les tests de toxicité des algues présentes en Nouvelle-Calédonie n'ont pas permis de retrouver expérimentalement les lésions d'entérite hémocytaire sur *P. stylirostris* ; la recherche de toxines effectuée sur *Artemia salina* s'avère de même négative, ainsi que leur mise en évidence par chromatographie HPLC. Les différents essais menés n'ont donc pas permis d'établir le rôle direct de ces algues dans le déclenchement du syndrome 93, conduisant ainsi à l'abandon de la « piste algues » (anonyme, (a), 1994).

A partir de la mi-October, le phénomène de mortalité est considérablement estompé. Cependant, l'année 1994 confirmera une situation fragile avec notamment pour les élevages menés en saison fraîche de mauvais résultats de survie et apparition de pics de mortalité massive.

L'isolement à partir de crevettes moribondes de bactéries du genre *Vibrio* dès le début de l'année conduit à explorer une hypothèse bactérienne (Aquacop *et al.*, 1994). Cette hypothèse repose essentiellement sur la présence en quantités anormalement élevées de bactéries dans l'hémolymphe des crevettes, de l'allongement du temps de coagulation de ces animaux et de l'observation en histologie classique de nodules hémocytaires septiques. Deux principales espèces de *Vibrio* seront identifiées (*alginoliticus* et *harveyi*) parmi plusieurs présentes en élevage. Cependant, à la fin de l'année 1994, sur la base d'un typage moléculaire de quelques souches disponibles, il semble difficile de considérer une souche particulière de *Vibrio* comme responsable des divers épisodes de mortalité. Ces germes pourraient n'exprimer leur pouvoir pathogène qu'à la faveur d'une extrême faiblesse des animaux ou bien de pathologies intercurrentes, et seraient donc opportunistes. Des études complémentaires sont en cours, afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

C'est au mois de Novembre 1994 que sont observées, sur des individus expérimentalement stressés, des lésions de type inclusions basophiles dans l'organe lymphoïde principalement. Des observations en MET ont permis la description d'organismes intracellulaires de type Mollicutes associés à ces anomalies observées en histologie. Ces lésions évoquent, d'autre part, la possibilité d'une étiologie virale. Les premières investigations faites dans ce sens, n'ont cependant pas encore permis de confirmer cette hypothèse.

Début Mars 1995, le phénomène nous rappelait à sa mémoire : après une saison chaude, propice aux élevages (qui connaissent alors des taux de survie de l'ordre de 50-60%), les premières perturbations météorologiques à l'entrée de l'hiver s'accompagnaient d'une reprise de mortalité, s'exprimant sur l'ensemble des fermes. Le syndrome 93 est donc toujours là, s'exprimant notamment au cours de la saison fraîche et à l'occasion de perturbations du milieu d'élevage, zootechniques ou météorologiques, que nous appelons plus généralement stress.

1-2 : approche des maladies en aquaculture

1-2-1 : généralités sur la pathologie en aquaculture

De même que les autres productions animales, la pénéculture est frappée par diverses maladies dont certaines se comportent comme des facteurs limitatifs de la quantité ou de la qualité de la production. Nous appellerons maladie toute perturbation physiologique non compensée se traduisant au minimum par une baisse des performances zootechniques attendues et fréquemment par l'apparition d'anomalies du comportement (symptômes) ou de l'intégrité corporelle (lésions), pouvant aboutir à la mort des sujets atteints. Si ce sont les aspects lésionnels et léthaux qui retiennent le plus souvent l'attention, les baisses de performances ont une incidence économique évidente.

La santé des animaux est mise à mal par des bioagresseurs (des parasites, des champignons, des virus ou des bactéries) dont l'action néfaste peut être spontanée ou induite par les pratiques zootechniques. Les concentrations animales rencontrées en élevage exacerbent les effets néfastes de nombreux agents pathogènes ; tandis que le confinement empêche la fuite devant le milieu hostile. Comme chez les autres animaux, le développement de l'élevage précède et révèle les pathogènes.

En fait, nous ne disposons que de peu de possibilités de protéger les espèces aquacoles vis à vis des maladies infectieuses du fait de certaines caractéristiques des animaux que nous étudions. D'une part, les traitements, pour des espèces le plus généralement élevées en milieu ouvert, posent les problèmes des quantités de substances à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans le milieu. De ce fait, ce type d'approche pour contrôler les maladies infectieuses ne semble pas une voie à privilégier.

D'autre part, la vaccination, ou immunoprophylaxie, au sens conventionnel du terme, reste sans objet chez les pénéides du fait de leur absence de réponse immune spécifique. Il est important de souligner que ces animaux ne possèdent pas de lymphocytes B et de lymphocytes T, les cellules qui sont directement impliquées dans les réponses spécifiques vis à vis des agents pathogènes chez les vertébrés et qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination.

Au vu de ces éléments, les seules façons de protéger efficacement les invertébrés marins d'intérêt économique vis à vis des maladies infectieuses sont de mettre au point des techniques de diagnostic sensibles et fiables, de contrôler certains paramètres du milieu d'élevage ainsi que d'obtenir des populations d'animaux présentant une « résistance » à certaines maladies. Ce sont ces voies que nous avons tenté de développer dans notre approche du syndrome 93.

1-2-2 : les maladies connues de *Penaeus stylirostris*

Le développement de l'aquaculture et l'intensification de l'élevage de la crevette ont révélé une série d'agents pathogènes, virus, bactéries, champignons et parasites. De sorte que depuis une vingtaine d'années, la pathologie des pénéides d'élevage a fait l'objet de nombreux travaux. Parmi les maladies rencontrées en élevage, un certain nombre sont encore d'étiologie inconnue ou du moins incertaine (Lightner 1992).

L'Infectious Hypodermal Hematopoietic Necrosis (IHHN) est très vraisemblablement le syndrome viral le plus sévère pour *P. stylirostris*, même si ce virus (picornavirus) affecte diverses espèces élevées de par le monde. Chez *P. stylirostris*, l'infection se traduit le plus souvent par une épizootie provoquant une très importante mortalité. Les symptômes de l'infection à IHHN ne sont pas spécifiques : on note chez les juvéniles infectés une baisse de la consommation de l'aliment, suivie de changements d'apparence et de comportement. Les crevettes atteintes nagent lentement vers la surface, s'y immobilisent, puis coulent en tournant sur elles-mêmes (face ventrale vers le haut). A ce stade, les crevettes présentent souvent des marques blanches ou beiges, principalement à la jonction entre les tergites abdominaux. Cet aspect s'estompe, et les crevettes moribondes ont un aspect bleuté, ainsi qu'une opacification de la musculature abdominale, Lightner, 1988 et 1992. Chez les crevettes plus âgées, l'infection par le virus IHHN peut se traduire par un affaiblissement général favorisant des pathologies opportunistes (vibrioses en particulier), Brock et al., 1992. Ces symptômes sont très peu spécifiques de l'infection à IHHN et ne permettent qu'une suspicion dans les cas où la prévalence de l'infection à IHHNV n'est pas connue.

La souche de *P. stylirostris* élevée au COP est une souche résistante au virus IHNV. La résistance de cette souche se traduit du point de vue épidémiologique par le fait que les animaux apparaissent comme étant porteurs sains du virus, ceci se traduisant par des résultats zootechniques comparables à ceux obtenus avec des élevages de *P. vannamei*, Weppe *et al.*, 1993.

Du point de vue anatomo-pathologique, les lésions observées sont des lésions nécrotiques non spécifiques affectant les tissus d'origine ecto- et mésodermique. La lésion pathognomonique de l'infection par le virus est la présence de corps d'inclusions nucléaires éosinophiles (Corps de Cowdry de type A). Le diagnostic histologique est donc possible, mais délicat et peu fiable sur des cas d'infection peu sévère ou sur des populations où la maladie a une faible prévalence. La mise au point d'une sonde nucléaire permet aujourd'hui de disposer d'un outil diagnostique performant. Le kit (ShrimpProbe IHNV DiagXotics) fonctionne sur le principe de l'hybridation moléculaire ADN/ADN (ADN viral/ADN sonde marquée) et offre ainsi une très grande spécificité et une plus grande facilité d'interprétation.

Penaeus stylirostris est aussi affecté par un baculovirus de type A, le Baculovirus *Penaei* Couch (BP). Ce virus sévit essentiellement sur le continent américain (USA, Brésil, Mexique) où il connaît diverses espèces hôtes : *vannamei*, *duorarum*, *aztecus*, *setiferus*.... Le BP est responsable de sévères épizooties dans les élevages larvaires et jusqu'aux stades juvéniles. En dehors d'une mortalité aiguë ou parfois chronique, un grand nombre de signes peuvent être enregistrés lors de ces épisodes : réduction de la consommation d'aliment, taux de croissance faible, foiling sur les surfaces corporelles et les branchies. Le signe particulier des infections à BP est un corps d'occlusion polyédral caractéristique dont la taille est comprise entre 0,5 et 20 µm (Polyhedral Inclusion Body ou PIB) qui est retrouvé dans l'hépatopancréas et les cellules épithéliales du midgut. Ces corps d'inclusion sont éosinophiles à la coloration hématoxyline éosine.

Diverses bactéries sont susceptibles d'affecter les animaux en élevage parmi lesquelles *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pasteurella*, *Rickettsia*, etc... Plusieurs espèces de *Vibrio* ont été décrites comme pathogènes notamment *alginolyticus*, *harveyi*, *penaeicida* (Lightner, 1988, Masayo *et al.*, 1995).

Des champignons de type *Lagedinium*, *Sirolopidium* et *Haliphthoros* ont été décrits fréquemment comme agents de mycoses notamment en élevage larvaire. Cette liste n'est pas exhaustive et la littérature fait état d'un grand nombre d'agents potentiels (*Fusarium*, *Atkinsella*, *Leptomitius*, *Saprolegnia*, etc...).

De nombreux parasites, représentants des groupes des haplosporidies, microsporidies (*Nosema*, *Pleistophora*), grégarines (*Nematopsis*, *Cephalolobus*), trématodes (*Parorchis*, *Microphallus*, *Opecoeloides*), cestodes (*Parachristinella*, *Prochristinella*), nématodes (*Leptolaimus*) peuvent affecter les pénéides.

Un certain nombre d'agents considérés comme épicommeaux ont été décrits : *Epistylis* ou *Zoothamnium* représentants du groupe des ciliés, des algues bleues vertes de type *Spirulina* ou encore des bactéries des genres *Leucothrix*, *Cytophaga* ou *Flexibacter*.

Nous avons vu, en outre, que diverses maladies dont l'étiologie était plus ou moins connue avaient été décrites. Citons pour mémoire la red disease (colorations anormales rouges des appendices), blunted head disease (associée à des marées rouges), hemocytic enteritis (inflammation hémocytaire de l'épithélium muqueux de l'intestin postérieur - associée à des toxines bactériennes ou d'algues bleues vertes), black gill syndrome, black death disease, etc...

On le voit ici, la liste des affections, maladies et agents pathogènes est bien longue quoique non exhaustive. Il semble en outre que nos travaux actuels doivent encore l'alourdir.

1-2-3 : quelques expériences en la matière

La production mondiale de crevette d'élevage pour l'année 1994 aura été de 733 000 tonnes, soit une augmentation substantielle par rapport aux niveaux relativement bas de l'année 1993 (Rosenberry, 1994). La part de l'aquaculture dans la production mondiale de crevettes est passée au cours des dix dernières années de 5 à près de 25%. Cependant, les situations par pays producteur restent disparates. La Thaïlande a connu une année particulièrement productive alors que la Chine enregistre une nouvelle mauvaise année, et que l'Equateur est

confronté à de graves difficultés sanitaires. Ceci marque la diversité des situations des pays producteurs. On évalue la surface d'élevage à 1 147 300 hectares pour environ 51 107 fermes et quelques 4 478 écloséries.

La production des Etats Unis est essentiellement localisée à Hawaii, en Caroline et au Texas. Cette dernière région d'élevage est la principale, avec des élevages semi-intensifs (environ 90%) et intensifs. L'espèce produite est avant tout *Penaeus vannamei*. En 1994, la production des Etats Unis a peu augmenté du fait d'épisodes d'IHHN dans d'importantes écloséries industrielles et de maladies bactériennes comme la NHP (necrotizing hepatopancreatitis) qui a affecté lourdement le Texas. Cette dernière sévit depuis 1985, touchant les élevages parfois sévèrement (jusqu'à 95% de mortalité). Les éleveurs ont eu recours à des traitements antibiotiques, notamment à l'oxytétracycline (Frelier, 1994 ; Frelier *et al.*, 1994). A Hawaii, plusieurs écloséries auraient été affectées par le virus du Taura Syndrome. La production, en 1994 aura été de l'ordre de 2000 tonnes (poids vif).

L'Equateur a été confronté au cours de cette année 1994 au Taura Syndrome, maladie virale qui avait fait son apparition sur quelques fermes de la région de Guayaquil au cours de l'été 1992. Depuis le mois de Mars 1993, le Taura Syndrome est devenu l'entité pathologique prédominante en grossissement dans cette région. En 1994, les éleveurs ont travaillé dans le sens d'une gestion de la situation en développant des stratégies de survie en présence de ce syndrome. Le nom de Taura est venu du fait que les premiers cas sont survenus à quelques 25 kilomètres de Guayaquil, dans des fermes situées le long de la rivière Taura. Cette maladie avait reçu dans un premier temps le joli nom de "la colita roja". Le Taura Syndrome avait tout d'abord été attribué à l'utilisation de substances fongicides dans les bananeraies (Lightner et Redman, 1994). Au cours des 3 premières semaines de grossissement, les juvéniles se comportent normalement puis brusquement ne s'alimentent plus et meurent. Cette année, les éleveurs équatoriens développent de nouvelles voies en modifiant la gestion de paramètres d'élevage comme les densités de post-larves à l'ensemencement des bassins, les renouvellements d'eau, etc... L'utilisation d'une espèce apparemment résistante, *Penaeus stylirostris*, semble une solution envisagée aujourd'hui. Bien souvent, cependant, quitter la zone de la rivière Taura apparaît comme la solution de choix. Les estimations portent à 40% des bassins actuellement à sec, notamment sur les plus grosses exploitations. Le risque lié à cette maladie n'est aujourd'hui pas maîtrisé.

tableau n° I : données relatives à la production équatorienne de pénéides d'élevage.

Equateur :	1989	1990	1991	1992	1993	1994
tonnes	45 000	73 000	100 000	95 000	90 000	100 000
hectares	70 000	100 000	145 000	120 000	90 000	90 000
kg/ha	643	730	690	792	1000	1111
fermes	1 500	1 500	1 700	1 500	1 250	1 200
% prod. mond.		75	74,9	73,4	68,2	68

Le cas de Taïwan est, de même, intéressant du point de vue du pathologiste. Peu de pays connaissent, en effet, les aléas de production comme les connaît cette île. En 1987, ce pays était certainement en tête des producteurs de crevette d'élevage, mais en 1989, du fait notamment d'une sur-intensification, de maladies et de problèmes de qualité d'eau, la production devait s'effondrer. Cette production en 1987 était de l'ordre de 70 000 tonnes avec la perspective à l'horizon 1995 d'une production de 90 000 tonnes . En 1994, Taïwan n'aura en fait produit que 25 000 tonnes de crevettes.

Les difficultés rencontrées par les grossisseurs taïwanais avait été considérées comme directement liées à une dégradation globale des conditions d'élevage : surcharge en matière organique des fonds de bassins, épuisement rapide de la productivité naturelle du bassin révélant ainsi les carences de l'aliment (Aquacop, 1989). Cette explication s'était vue confortée par le fait qu'à cette époque, certaines fabriques d'aliment, pour diminuer le coût de production, modifiaient les formules et faisaient un usage abusif des "feed extender". Il est intéressant de rappeler les diverses hypothèses émises à la fin des années 80 : présence du virus MBV, algues bleues toxiques, faiblesse des post-larves "maternées" excessivement en éclosérie et résistant mal ensuite aux conditions d'élevage des bassins de grossissement (Aquacop, 1989).

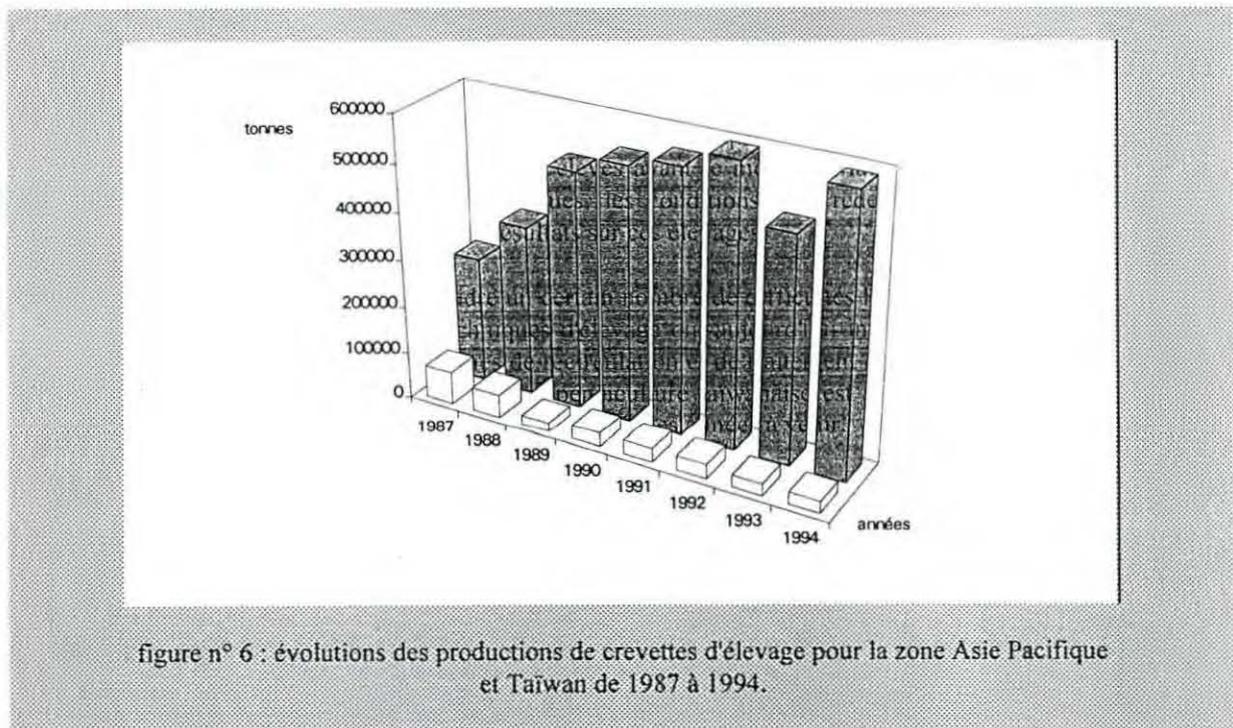
tableau n° II : données relatives à la production taïwanaise de pénéides d'élevage.

Taiwan :	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994
tonnes	70 000	50 000	20 000	30 000	30 000	30 000	25 000	25 000
kg/ha	7 000	7 000	5 000	3 750	3 750	6 000	3 571	3 571
fermes	5 000	1 300	-	-	2 000	2 500	2 000	2 000
hectares	10 000	10 000	4 000	8 000	8 000	5 000	7 000	7 000

Aujourd'hui, l'élevage de *Penaeus monodon* ne représente plus que 75% de la production de l'île (20% de *P. japonicus*). En 1993, *P. monodon* et *japonicus* élevés avant le mois de Mai devaient subir près de 90% de mortalité puis, pour des raisons encore inconnues, les conditions sont redevenues favorables au cours du deuxième semestre, permettant de meilleurs résultats sur ces élevages.

Les scientifiques taiwanais ont eu à résoudre un certain nombre de difficultés liées à l'élevage intensif en milieu tropical depuis cette année 1987. Les techniques d'élevage ont aujourd'hui intégré l'utilisation de probiotiques dans les aliments et les bassins, des systèmes de recirculation et de traitement de l'eau, des vaccins et surtout un contrôle rigoureux des paramètres d'élevage. La pénéculture taïwanaise est à l'heure actuelle dans une phase ascendante et pourrait se trouver de nouveau sur pied dans les années à venir.

Notons que l'effondrement de la production de ce pays à la fin des années 80 a considérablement favorisé l'accroissement et le développement de cette activité dans le Sud Est Asiatique entre 1988 et 1992. C'est en effet pendant cette période que des consultants, experts et provendiers taïwanais ont exporté leur savoir faire et leur expérience (voir la figure n°6). La Thaïlande, notamment, doit une part importante de son développement à Taïwan. Aujourd'hui, c'est vers la Chine que se tournent tout naturellement les pas de ces experts.



Ce rapide tour d'horizon montre par quelques exemples concrets que la pathologie est un aléa majeur de l'élevage pouvant parfois constituer un des facteurs limitants au développement de cette activité.

1-2-4 : vers un concept de pathologie intégrée

Il ressort d'une première approche du syndrome 93 que le milieu d'élevage, de par ses modifications (perturbations météorologiques par exemple), sa contamination (développement bactériens ou blooms planctoniques), ou bien sa gestion (intensification du système notamment), joue un rôle prépondérant dans le déclenchement de la maladie. L'image qui se dégage est la mise en présence d'animaux diminués dans leurs capacités de défense et de résistance, avec un agent pathogène. Le fragile équilibre instauré entre l'animal d'élevage et son environnement est rompu. C'est pourquoi, il nous a semblé judicieux de conserver une approche globale du système d'élevage dans l'étude du syndrome 93. Chaque facteur déterminant de ce phénomène pressenti comme multifactoriel devrait ainsi pouvoir être mis en lumière.

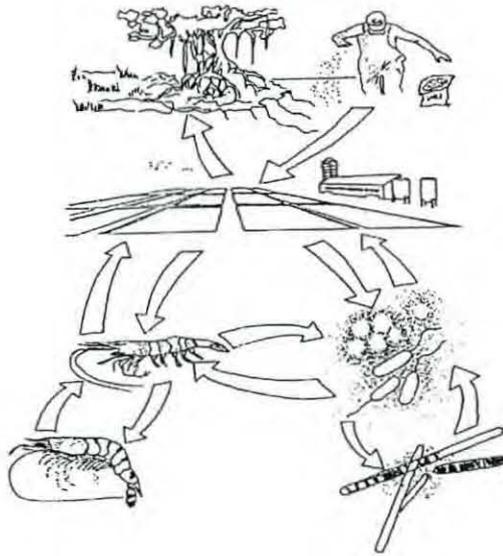


figure n° 7

schéma des principaux compartiments impliqués dans le déclenchement des maladies d'élevage.

La première étape de notre démarche a été de compartimenter le système d'élevage dans le but de sa modélisation (cf figure n°7). Les animaux, le bassin de grossissement et les agents pathogènes constituent les trois principaux compartiments. Chacun de ces compartiments est étudié en propre : qualification des pathogènes en termes, schématiquement, d'identification, de virulence, puis qualification du milieu en paramètres biologiques, physicochimiques, et enfin, qualification des animaux en données physiologiques et paramètres zootechniques. Dans un second temps, les relations entre ces compartiments pris deux à deux sont envisagées de façon simple ; citons pour exemple, le cycle du pathogène en fonction des paramètres du milieu, croissance ou résistance des animaux en fonction de ces paramètres, etc...

En outre, ces trois compartiments entretiennent des relations privilégiées (quoique non exclusives) avec des compartiments que nous qualifierons de secondaires, ou connexes, ici : environnement et pratiques culturelles pour le bassin, espèces animales proches et commensales pour les animaux, microorganismes de l'environnement pour les pathogènes sont quelques exemples de compartiments connexes qu'il est possible d'identifier. Ces derniers ont un rôle non négligeable d'un point de vue épidémiologique dans la mesure où ils peuvent constituer autant de facteurs prédisposant ou déclenchant du phénomène, de réservoirs naturels ou de vecteurs du pathogène. Leur étude à titre individuel dans un premier temps puis en termes de relations au sein du système d'élevage est donc envisagée^d.

^d A titre d'exemple, la croissance d'algues phytoplanctoniques peut être influencée par la présence de certains genres bactériens (cf figure n°7). Une souche de *Vibrio anguillarum* a un effet promoteur pour *Chlorella* et *Tetraselmis* (Ukeles et Bishop, 1975). Alors que *Pseudomonas aeruginosa* a un effet inhibiteur pour *Tetraselmis* (Berland *et al.*, 1972). De façon analogue, des extraits de cultures de *Chlorella* ont un effet promoteur pour le développement de *Vibrio alginolyticus* (Morishita *et al.*, 1978). *Skeletonema* stimule la croissance de *Flavobacterium* et inhibe *Vibrio* et *Pseudomonas* (Kogure *et al.*, 1979). *Tetraselmis* ou *Isochrysis* n'ont pas d'effet sur *Vibrio* (Austin *et al.*, 1992, Murchelano *et al.*, 1969).

Cette démarche devrait permettre une approche globale du phénomène. La connaissance de celui-ci débouche sur la possibilité d'une gestion rationnelle du système d'élevage en présence de pathogènes potentiels.

En effet, nous avons dit plus haut que nous ne disposons que de peu de possibilités de protéger ces animaux vis à vis des maladies infectieuses du fait de certaines caractéristiques de ces espèces. D'une part, les traitements (solutions à court terme), pour les pénéides, espèces élevées en milieu semi-ouvert, posent les problèmes des quantités de substances à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans le milieu. D'autre part, la vaccination (aux mérites vantés par de nombreux laboratoires), au sens conventionnel du terme, reste sans objet chez ces espèces du fait rappelons-le de leur absence de réponse immune spécifique.

Au vu de ces éléments, les seules façons de protéger efficacement les invertébrés marins d'intérêt économique vis à vis des maladies infectieuses sont de mettre au point des techniques de diagnostic sensibles et fiables⁴, de contrôler certains paramètres du milieu d'élevage ainsi que d'obtenir, à long terme, des populations d'animaux présentant une « résistance » ou plutôt une certaine « tolérance » à certaines maladies identifiées.

Comment apparaît la maladie à l'issue de notre réflexion et de cette compartimentation du système d'élevage ?

La maladie apparaît en fait comme une résultante d'un grand nombre possible de paramètres ou facteurs du système d'élevage. Ce constat dépasse le simple effet de différents paramètres sur la santé des animaux mais établit la santé d'un système comme une production de celui-ci, au même titre que le tonnage produit par exemple. Si l'on caractérise ce système en termes d'entrées et de sorties, la santé, ou la maladie, sont une sortie de ce système. C'est l'observation de ce système, selon l'indicateur santé en correspondance avec ses diverses entrées (relatives aux influences humaines, environnementales, zootechniques ou infectieuses...) qui permettra d'interpréter la maladie en termes de facteurs de risques et de la modéliser. Cette démarche rejoint le schéma écopathologique à déterminisme multifactoriel. L'intérêt d'une telle démarche serait bien entendu considérablement amoindri si un agent pathogène à fort degré de contagiosité s'avérait responsable du syndrome 93 (cf questions posées par les résultats de pathologie expérimentale avec la souche AM23/1042 de *Vibrio sp.*). La situation serait alors celle d'une épizootie, à laquelle, la démarche plus classique et parfois qualifiée de pasteurienne, répond alors. C'est l'absence aujourd'hui de données relatives à ce type d'agent causal (sans en exclure l'effet pathogène) qui oriente notre démarche vers l'écopathologie. D'autant que l'accumulation de facteurs défavorables à l'activité d'élevage, notamment dans des écosystèmes fragiles (mangroves) est particulièrement propice à l'exaltation de la virulence de nombreux agents infectieux endogènes.

⁴ Pour le premier point, il est important de rappeler que les épizooties chez les invertébrés marins, ont été souvent et sont encore étudiées essentiellement au travers de l'histologie et de la microscopie électronique qui bien que restant des techniques fondamentales présentent certaines limites. En effet, elles sont consommatrices de temps aussi bien pour la préparation des échantillons que pour leur observation. Elles sont par ailleurs relativement inadaptées à la quantification des infections du fait de la difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons et à détecter de faibles niveaux d'infection. Dans ce cadre, il est nécessaire aujourd'hui de développer de nouveaux outils de diagnostic. En effet, en pratique les maladies pourraient mieux être contrôlées si des analyses pouvaient être réalisées sur un grand nombre d'animaux à différentes étapes de production, mais également avant tout transfert d'envergure. De nouvelles techniques peuvent être attendues grâce aux progrès réalisés dans les domaines des biotechnologies et de la biologie moléculaire.

2^{ème} partie : La politique de recherche en pathologie des pénéides en soutien à la filière crevettes en Nouvelle-Calédonie

Nous avons vu que les perspectives de développement de la filière crevette étaient favorables, en dehors des difficultés conjoncturelles liées au syndrome 93. Le développement de cette filière naissante constitue un axe prioritaire aux yeux des Provinces Nord et Sud notamment. Les raisons de cet intérêt sont multiples et l'on peut citer : le fort potentiel de sites propices à la production de crevettes d'aquaculture, la création potentielle de fermes génératrices d'emplois qui répond à un souci d'aménagement du Territoire, enfin, une production qui constitue la deuxième source d'exportation de la Nouvelle-Calédonie après le nickel. C'est pourquoi, les difficultés rencontrées depuis le second trimestre 1993 en élevage ont amené le GIE Recherche Aquacole à développer une politique de recherche en pathologie en soutien de la filière crevettes en Nouvelle-Calédonie.

2-1 : Le programme de recherche en pathologie dans sa formulation initiale :

2-1-1 : contexte de son établissement

Le programme de recherche en pathologie a été présenté lors de la troisième réunion du comité mixte (le Mardi 25 Octobre 1994)^d.

Une réflexion entamée lors de l'une mission IFREMER de septembre 1994 en Nouvelle-Calédonie (J.L. Martin, T. Renault et M. Le Groumellec), a permis de définir, en collaboration avec le LTDV, un programme de recherche. L'ensemble du projet implique différentes équipes et d'organismes scientifiques (IFREMER, GIE/RA, LTDV, ORSTOM, IPParis, URPIG, DRIM, CREMA). Le programme est présenté dans ce qui suit ainsi qu'une évaluation des coûts supplémentaires de fonctionnement (94/95), de personnels supplémentaires nécessaires (12 mois, 1995), et de coordination du programme. Cette évaluation est faite sur la base du programme principal et de son annexe établis pour l'année 1995 : un financement complémentaire sera demandé en 1996, rechiffré en fonction des résultats obtenus au cours de la première année de travail.

Le programme qui comprend deux volets est exposé ci-dessous. Coordonné par l'IFREMER, il implique, aux côtés de la SASV, d'autres laboratoires IFREMER (COP/Tahiti, URPIG/La Tremblade) mais aussi des laboratoires non IFREMER, métropolitains (Institut Pasteur/Paris) ou territoriaux (CIRAD Païta, ORSTOM Nouméa, et LTDV).

Une convention entre l'IFREMER et le LTDV - les 2 laboratoires qui devraient être le plus impliqués dans ce programme de recherche - est actuellement en cours d'élaboration. Un projet de convention, permettant de définir les moyens financiers et humains à mettre en place au niveau de ces laboratoires, était présenté au Comité Mixte.

^d Etaient présents à cette réunion qui s'est tenue dans les bureaux IFREMER de Nouméa, le Mardi, 25 Octobre 1994, de 8h15 à 11h : M. Y. Magnier représentant de la Province Sud, avec comme invité, M. R. Farman du Service de la Mer ; M. T. Smali, du Service des Pêches de la Province Nord, représentait C. Tchoeaoua ; M. D. Wadrawane, de la Section pêche du DDE et représentant de la Province Iles ; MM. J. Michaut et P. Cadeau, représentants du Territoire ; les représentants IFREMER : M. Dussert et C. Galinie avec comme invités : MM. J.C. Ansel de la DAF et R. Costa du LTDV, A. Michel, Directeur des Ressources Vivantes de l'IFREMER, en mission sur le Territoire, ainsi que M. J.M. Devaux, Directeur administratif et financier du GIE Recherche Aquacole, enfin M. F. Berthe et Mme N. Mainguet de la SASV. Etaient présents au titre d'experts invités par l'ensemble du Comité Mixte : M. C. Habaut, chargé de mission pour la recherche et la technologie, Mme Favreau, directeur de la SOPAC, accompagnée de MM. Jeandot et Goxe, ainsi que M. H. Martin de l'ERPA auditeur libre impliqué dans la filière aquaculture crevettes.

Rappel et hypothèses de travail :

L'image qui se dégage dans une première approche de la situation est la mise en présence d'animaux diminués dans leurs capacités de défense et de résistance, avec un agent pathogène, vraisemblablement bactérien. La "maladie" en tant que telle apparaît aujourd'hui comme le point final d'un enchaînement qui a conduit à l'affaiblissement de l'animal. Le fragile équilibre instauré entre l'animal d'élevage et son environnement est rompu. La situation actuelle, son caractère général sur le Territoire, montre qu'il s'agit moins d'un accident que d'un dérèglement du milieu d'élevage.

Les hypothèses sont au nombre de deux et sont directement issues de l'analyse de la situation :

1. l'émergence de pathogènes, *Vibrio spp.* notamment,
2. la détérioration des conditions d'élevage.

But de la démarche :

Il est d'établir un plan de lutte basé sur la détection précoce de situations critiques caractérisées par la présence d'un agent pathogène (diagnostic) et concomitantes à l'existence de facteurs de risques (conditions favorisantes).

Objectifs :

Ils correspondent étroitement aux hypothèses formulées ci-dessus :

1. diagnostic de l'agent étiologique,
2. identification des conditions favorisantes.

Stratégie :

la stratégie de recherche s'articule donc sur deux volets répondant à chacun de nos objectifs :

- 1^{er} volet : diagnostic de l'agent étiologique,
- 2^{ème} volet : identification des conditions favorisantes.

les moyens permettant d'aboutir aux objectifs fixés sont donnés dans ce qui suit.

2-1-2 : le programme de recherche en pathologie

diagnostic de l'agent étiologique

① diagnostic de l'agent étiologique

1. confirmation diagnostique

- I-1-1 : traitement des données acquises
- I-1-2 : inventaire des agents pathogènes
- I-1-3 : établissement d'un tableau de correspondances

2. taxonomie de l'agent pathogène

- I-2-1 : identification des espèces bactériennes impliquées
- I-2-2 : caractérisation phénotypique des souches isolées
- I-2-3 : développement d'outils nouveaux de diagnostic

3. étude de virulence

- I-3-1 : reproduction expérimentale de la maladie
- I-3-2 : étude *in vitro* de facteurs de virulence

4. chimiothérapie :

- I-4-1 : sélection de molécules actives
- I-4-2 : application du modèle expérimental
- I-4-3 : essais terrain de molécules

1. Confirmation diagnostique.

Les analyses effectuées en histologie permettront de vérifier, ou non, la présence de bactéries associées aux lésions nodulaires de la glande digestive et d'autres organes chez des crevettes issues de bassins présentant une mortalité anormale. Ces observations seront doublées de la mise en culture d'agents bactériens présumés. Par ailleurs elles révéleront la présence ou l'absence de tout autre agent pathogène décrit ou non, l'absence ou la présence d'anomalies nucléaire ou cellulaire. L'ensemble de ces observations sera effectué de même sur une population présumée saine. Enfin, la technique de prélèvement inclue la possibilité ultérieure d'observations en microscopie électronique. Ces observations auraient quant à elles un double intérêt : l'analyse au niveau ultrastructural des lésions nodulaires de la glande digestive associées à la présence de bactéries, et d'autre part, d'images anormales en histologie classique.

Ce premier point s'articule de la façon suivante :

I-1-1 : traitement de données acquises en bactériologie et en histologie.

I-1-2 : inventaire des agents pathogènes.

I-1-3 : établissement d'un tableau de correspondances, signes/lésions.

Résultats escomptés:

- confirmation de l'étiologie bactérienne.
- exclusion d'autres pathogènes.
- mise au point d'un premier outil diagnostique de type grille d'examens.

2. Taxonomie de l'agent pathogène :

La taxonomie procède de trois étapes : la constitution de groupes au sein d'une population, leur identification, et leur caractérisation. Les souches bactériennes impliquées en pathologie aquacole sont en général des représentants d'espèces de l'environnement. Les techniques microbiologiques classiques utilisées en bactériologie médicale ne répondent pas aux contraintes imposées par la versatilité métabolique de ces bactéries. Leur étude fait appel aux principes adamsoniens de classification. Seule l'identification génomique des représentants des taxons établis permettra de lever l'ambiguïté de descriptions phénétiques. Le développement d'outils de caractérisation basés sur les résultats de typage est cependant nécessaire à leur diagnose. Ces outils seront utilisés à des fins diagnostiques, épidémiologiques et écologiques.

La séquence suivante est proposée pour la réalisation de ce point :

I-2-1 : identification des espèces bactériennes impliquées.

I-2-2 : caractérisation phénotypique des souches bactériennes isolées.

I-2-3 : développement d'outils nouveaux, spécifiques.

Résultats escomptés:

- typage des bactéries pathogènes.
- mise au point d'un outil diagnostique adapté au germe en cause.
- mise à disposition d'un premier outil permettant des études de type épidémiologie et écologie microbienne.

3. Etude de virulence :

La pathogénicité d'une souche bactérienne est conditionnée par l'acquisition de facteurs de virulence. Dans un premier temps, cette pathogénicité sera appréhendée de manière globale par l'intermédiaire d'un modèle de pathologie expérimentale. La mise au point de celui-ci doit permettre de reproduire les signes et les lésions de la maladie ainsi que leur conséquence, la mort. Ce modèle constitue fondamentalement un outil d'étude de la pathogénie mais aussi et surtout une voie pour tester divers moyens de lutte, prophylactiques et thérapeutiques. Il sera doublé d'une étude *in vitro* des facteurs de virulence notamment bactéricidie, adhésion sur tapis cellulaires, cytotoxicité, caractérisation de toxines. Cette étude de la virulence de l'agent pathogène a pour corollaire la définition d'un plan de lutte offensif ou défensif, basé sur des moyens prophylactiques ou thérapeutiques. Rappelons enfin la nécessité d'un tel outil comme préambule au lourd travail de sélection génétique.

Cette étude repose sur les points suivants :

I-3-1 : reproduction expérimentale de la maladie.

I-3-2 : étude *in vitro* de facteurs de virulence.

Résultats escomptés :

- définition du caractère pathogène de l'agent causal.
- mise au point d'un outil de recherche et de valorisation de moyens de lutte.

4. Chimiothérapie :

Rupture de relations entre commensaux ou émergence d'un pathogène spécifique, le rétablissement de la situation pourrait faire appel à la chimiothérapie, au moins de façon transitoire. Cette éventualité est pour nous l'occasion de souligner les risques inhérents à de telles pratiques. Masquer le déséquilibre entre l'animal d'élevage et son environnement reviendrait à terme à favoriser et à pérenniser une situation hautement instable qu'il paraît judicieux de tenter de résoudre par des voies alternatives, plus élégantes et plus sûres. Quoiqu'il en soit, le diagnostic thérapeutique reste la principale justification de tels essais. Le choix de molécules à visée thérapeutique se fera après contrôle de leur activité *in vitro* sur l'agent pathogène, de leur efficacité au cours

d'essais tant en modèle expérimental, qu'en manipulations sur le terrain. Ces essais présupposent la maîtrise de leur dosage et du contrôle de résidus dans la chair des animaux.

Les étapes de cette étude sont :

I-4-1 : sélection de molécules actives.

I-4-2 : application du modèle expérimental.

I-4-3 : essais terrain de molécules.

Résultats escomptés:

- confirmation thérapeutique.
- mise à disposition de moyens de lutte à court terme.

identification des conditions favorisantes

② identification des conditions favorisantes

1. état des techniques de production
 - II-1-1 : enquête retrospective
2. qualification du bassin
 - II-2-1 : quantification du flux d'azote entre les divers compartiments
 - II-2-2 : caractérisation des au cours des différentes phases d'élevage
 - II-2-3 : optimisation des pratiques de jachère ou d'assecs
 - II-2-4 : influence des sols enrichis sur déclenchement de la maladie
3. qualification de l'état originel des animaux
 - II-3-1 : élevage de post-larves issues de nauplii/géniteurs sélectionnées
 - II-3-2 : mise en élevage de post-larves obtenues sans antibiotiques
 - II-3-3 : mise en élevage de post-larves d'autres espèces pénéides
 - II-3-4 : critères de qualité des post-larves à l'ensemencement
4. qualification de l'état des animaux en cours d'élevage
 - II-4-1 : mise au point de tests de viabilité des animaux
 - II-4-2 : mesure des capacités d'adaptation des animaux
 - II-4-3 : évaluation de l'immunocompétence des animaux
 - II-4-4 : recherche d'indicateurs de mortalité
5. suivi des élevages
 - II-5-1 : enquête écopathologique
 - II-5-2 : réalisation des bilans d'azote
 - II-5-3 : stimulation et contrôle du phytoplancton
 - II-5-4 : suivi des eaux d'arrivée de différentes fermes
 - II-5-5 : suivi de l'évolution des paramètres du sol

1. Etat des techniques de production

Les techniques actuelles de production de pénéides sont issues de recherches de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent dont les résultats ont été transférés à des éleveurs. Chaque élevage est pour l'aquaculteur sujet d'analyse et source d'améliorations, de modifications. Cet état est en partie l'objet d'une enquête rétrospective dont le but, en utilisant les indicateurs aujourd'hui disponibles, est de décrire l'évolution de la pénéculture calédonienne en matière de pratiques zootechniques et de production, mais aussi d'environnement et de climatologie.

Il s'appuie essentiellement sur:

II-1-1 : une enquête rétrospective.

Résultats escomptés:

- mise en évidence des tendances générales de l'élevage de crevette et d'une modification éventuelle des pratiques zootechniques.
- formulation des hypothèses de facteurs explicatifs.

2. Qualification du bassin

L'aquaculture crevettes pratiquée sur le Territoire peut-être qualifiée de "semi-intensive" ou "semi-intensive intensifiée". Par opposition à des aquacultures plus intensives pratiquées sur des surfaces dures et artificielles, le point faible de nos systèmes d'élevage reste le fond de nos bassins, surface de marais naturels meubles et déjà riches en matière organique. Dans l'impossibilité de nettoyer complètement ces fonds de bassin entre chaque élevage, il s'avère important de mieux connaître les bilans de matière organique dans nos élevages.

Ces travaux ont débuté depuis début 1993 dans le cadre du Contrat "Soutien au développement de l'aquaculture crevettes"; ils permettront :

II-2-1 : la quantification des flux d'azote, traceur de matière organique, entre les différents compartiments de nos élevages.

II-2-2 : la caractérisation des bassins au cours des phases d'assec et de remplissage.

II-2-3 : l'optimisation de la pratique des assecs (ou jachères).

II-2-4 : la mise en évidence de l'influence de ces sols enrichis sur le déclenchement de la maladie.

Résultats escomptés:

- validation des pratiques zootechniques (assec, densité,...) pour une aquaculture pérenne;
- outil d'évaluation du vieillissement des bassins.

3. Qualification de l'état originel des animaux

Les laboratoires américains ont, en produisant une souche de crevettes SPF (Specific Pathogen Free), considérablement amélioré les résultats de certains élevages. Notre souche de crevettes serait quant à elle résistante au virus IHNV. Nos techniques de production en éclosion, avec antibioprévention, peuvent apparaître trop peu sélectives. Après plus de 25 générations obtenues en captivité, notre souche de crevettes pourrait avoir dégénéré.

Ce programme consiste en :

II-3-1 : la mise en élevage de post-larves obtenues à partir de nauplii sélectionnés.

II-3-2 : la mise en élevage de post-larves obtenues sans antibiotiques.

II-3-3 : la mise en élevage de post-larves d'autres espèces (*P. monodon*, autres).

II-3-4 : la définition de critères de qualité sur les post-larves à l'ensemencement.

Résultats escomptés:

- évaluation de l'aptitude initiale de l'animal à survivre aux conditions d'élevage.
- mise au point d'une démarche qualité lors de la phase éclosion.

4. Qualification de l'état des animaux en cours d'élevage

De l'état physiologique des crevettes dépend leurs capacités de résistance et de défense au pathogène. Pour accompagner les recherches sur l'influence du "milieu d'élevage" ou de la "chimiothérapie" sur le déclenchement de la pathologie, nous ne pouvons nous contenter de mesurer la survie globale obtenue sur les 6 mois d'élevage. L'état de l'animal doit pouvoir être apprécié tout au long de l'élevage

Cette qualification devra passer par:

II-4-1 : la mise au point de "challenges" permettant de tester la viabilité des animaux.

II-4-2 : la mesure des capacités d'adaptation (ex : capacité osmo-régulatrice).

II-4-3 : le suivi de la composition des hémolymphes.

II-4-4 : la mise en place d'indicateurs de mortalité (suivi de la biomasse, quantification de la mortalité)

Résultats escomptés :

- suivi de l'évolution des capacités de défense et de résistance des animaux.
- outil de mesure de l'efficacité de traitement ou de l'influence du milieu.

5. Suivi des élevages :

Le milieu d'élevage, peu contrôlable dans nos conditions, et dans lequel baignent le pathogène et la crevette, est certainement un facteur déterminant de nos pathologies. Il paraît important de pouvoir mesurer et/ou faire varier les différents paramètres de l'élevage tout en suivant l'apparition des pathologies, l'importance des mortalités, l'état physiologique des animaux et l'inventaire des pathogènes. Afin de pouvoir comparer l'état pathologique des différentes fermes du Territoire, un effort doit être porté sur l'uniformisation de la mesure des paramètres d'élevage.

Il consiste en :

II-5-1 : une enquête écopathologique.

II-5-2 : la réalisation des bilans d'azote.

II-5-3 : la stimulation expérimentale du phytoplancton.

II-5-4 : le suivi bactériologique et chimique de l'eau d'arrivée de différentes fermes.

II-5-5 : le suivi de l'évolution du sol (pH, potentiel d'oxydo-réduction).

Résultats escomptés :

- la mise en évidence des facteurs de risques au cours de l'élevage.
- la mise en évidence de nouveaux indicateurs.
- la mise au point d'un modèle prédictif.
- des propositions de monitoring.

Remarque :

Chacune des actions présentées dans ce qui précède fait l'objet d'un appendice technique correspondant à ce point particulier, et prend place en annexe au programme. Les appendices du premier volet sont donnés en annexe de ce document (Annexe n° 1).

2-1-3 : commentaires et financement

La présentation de ce programme a fait l'objet de discussions lors de la réunion du comité mixte au cours de laquelle il avait été présenté. Les divers commentaires faits au cours de cette réunion sont présentés dans ce qui suit, extrait des minutes de la réunion :

M. Habault exprime son inquiétude face à un problème complexe et à une démarche à long terme, s'interroge enfin sur les réponses à apporter dans l'immédiat. Il évoque la possible alternative d'élevages de *P. monodon*. M. Berthe lui répond qu'aujourd'hui, la preuve reste à faire que cette espèce peut traverser indemne la situation actuelle ; un élevage expérimental de cette espèce est en cours à la Station de Saint Vincent. L'élevage d'autres espèces peut être envisagé (*P. merguensis* ou *P. indicus*, notamment), cependant il est bon de rappeler que *P. stylirostris* avait été identifiée comme l'espèce la mieux adaptée aux conditions calédoniennes. Des stratégies de gestion d'élevage pourraient atténuer dans un premier temps les pertes d'animaux, le choix des dates d'ensemencement des bassins ou la commercialisation de calibres inférieurs en sont deux exemples. M. Jeandot rappelle que *P. stylirostris* correspond pour la filière à un marché établi. M. Galinié précise que la voie "expérimentation sur d'autres espèces" est inscrite dans le programme présenté par F. Berthe. Il rappelle toutefois les poids moyens limites de l'ordre de 10g. obtenus sur *P. indicus* (de nouvelles expérimentations confirmant ces résultats viennent d'être menées à Madagascar), l'impossibilité d'élever *P. japonicus* en saison chaude, le prix de 4 US\$/kg (départ ferme) obtenu en Asie pour *P. monodon*.

M. Farman propose une intervention du Service d'Economie Maritime de l'IFREMER (SEM) dans l'évaluation et l'intégration des sur-coûts imposés par la pathologie et sur la mise au point d'un système de gestion des élevages par informatique. A. Michel répond qu'il est venu apportant avec lui un logiciel de gestion d'élevage de crevettes mis au point par SANOFI^d. Enfin, F. Berthe précise sur le premier point de la question que l'on en est pas encore à évaluer l'impact de solutions sur les coûts de production mais bien plutôt à identifier ces solutions. Quoiqu'il en soit, il est important d'avoir ce souci en mémoire.

M. Michel ramène le débat sur les conclusions de l'exposé et la nécessité de dégager des moyens supplémentaires pour la recherche en pathologie. M. Jeandot souligne que si l'on évalue les pertes infligées par le syndrome 93 à la filière (soit environ 400 tonnes de crevettes perdues au cours de l'année), le budget demandé correspond à 60 FCP par kg. de crevettes.

M. Magnier se félicite de ce qu'un programme de travail ait été enfin établi, il trouve écho auprès de C. Habault. Retour au problème des moyens à mettre en oeuvre, M. Magnier évoque la possibilité pour les Provinces, bien sûr, de s'engager, il suggère, d'autre part, que la profession participe au financement. La réponse de M. Jeandot est catégorique: il est actuellement impossible aux fermiers, déjà lourdement touchés par la mortalité excessive en grossissement, de financer une telle recherche. M. Martin, soulignant sa présence en "auditeur libre", estime la situation catastrophique et rappelle la nécessité de soutenir la filière ; le budget prévisionnel du programme ne lui semble pas disproportionné aux enjeux et, lui qui a une certaine pratique des programmes CIRAD, se demande s'il n'est pas possible de faire "plus fort, plus cher et plus vite". L'IFREMER précise que ce programme a été monté, tout en tenant compte des moyens de recherche déjà en place sur le Territoire, sans se fixer de contraintes budgétaires. Toutes les voies qui peuvent être prospectées aujourd'hui ont été évaluées. D'autre part ce programme fait participer des laboratoires (COP notamment dont l'intégralité du budget patho passe sur la

^d ce logiciel est actuellement installé à la SASV.

crevette calédonienne) déjà financés par ailleurs. M. A. Martin trouverait judicieux de prévoir, aujourd'hui les voies qui pourraient être choisies demain, tout au moins au cours de l'année 1995. M. Costa, interrogé, confirme l'avis de l'IFREMER sur ce point : le programme défini aujourd'hui est bien le "programme maximum".

M. Smali assure son accord avec les schémas proposés tant sur le plan de la réorganisation de la station de Saint Vincent (centre technique/recherche) que sur celui de la recherche en pathologie. Il propose que la partie recherche soit menée ailleurs qu'à St Vincent compte tenu de la vétusté des structures. M Berthe revient sur le "plus vite et plus fort" en soulignant le fait que le programme s'appuie surtout sur des équipes déjà formées et rodées, cette structure quoique certainement lourde à coordonner ne connaîtra pas l'inertie d'un laboratoire neuf. M. Habault propose de faire avancer la réflexion sur l'avenir de la station par des propositions concrètes et de prendre date pour juin 95 ; une nouvelle organisation pouvant voir le jour au 1^{er} Janvier 96.

Sur le programme pathologie, le Territoire se chargerait des 2 techniciens du LTDV ainsi que des frais de fonctionnement ; les 2 Provinces concernées prendraient en charge le solde ainsi que les techniciens destinés à la SASV, recrutés au travers de l'association des producteurs sur financement des Provinces et accueillis à la station par le GIE/RA.

A l'issu de cette réunion, un accord de principe était donc obtenu sur le financement du programme par le Territoire et les Provinces Sud et Nord, sur la base de l'évaluation des coûts de fonctionnement du programme donnée dans le tableau n° III.

Ces coûts sont répartis entre les deux principaux acteurs - LTDV et GIE/RA - ainsi qu'il est indiqué dans le tableaux n° III (suite). Les financements ont été entérinés pour le Territoire et la Province Sud et sont en cours de vote pour la Province Nord.

La Province Nord n'a pas donné suite à son engagement de financement et propose aujourd'hui de revoir à la baisse le financement d'un programme dont elle ne sent pas les enjeux. La proposition de cette Province est de financer le programme à hauteur de sa part dans la production de crevettes d'élevage et sur la base de la superficie de bassins exploitée soit environ 20%. Ce retour sur l'engagement initial, outre la perte de temps qu'il engendre dans la course contre la montre engagée avec la maladie, conduit à une réduction substantielle du budget et donc de l'effort de recherche. Il constitue aujourd'hui un des facteurs limitants à l'avancement du programme.

Le financement du LTDV est effectif à l'heure actuelle, ainsi que le recrutement des deux techniciens prévus par le projet de recherche. La convention permettant de recruter le premier technicien à la station de Saint Vincent sur le financement de la Province Sud au travers de l'association des producteurs est en cours de signature.

tableau n° III : coûts opérationnels du programme de recherche en pathologie

coûts opérationnels globaux				
thème :	type :	opérateurs :	poste :	fonctionnement. :
I-1	diagnostic	LTDV-CIRAD-SASV-URPIG	1 TS	2.750 000
I-2	taxonomie	LTDV-SASV-IPP-COP	1 TS	3.250 000
I-3	virulence	COP-SASV-ORSTOM		400 000
I-4	chimiothérapie	LTDV-SASV-COP	1 TS	650 000
II-1	rétrospectif	LTDV-SASV		100 000
II-2	bassin	SASV-CREMA-ORSTOM		0
II-3	animaux à élever	SASV-LTDV	1/3 TS	300 000
II-4	animaux en élevage	SASV-ORSTOM-COP-DRIM	1/3 TS	500 000
II-5	suiivi des élevages	LTDV-CIRAD-ORSTOM-SASV	1/3 TS	100 000
Total :			4 TS	8.050 000

tableau n° III (suite) : coûts opérationnels du programme de recherche en pathologie.

coûts opérationnels LTDV				
thème :	type :	opérateurs :	poste :	fonctionnement. :
I-1	diagnostic	LTDV-CIRAD-SASV-URPIG	1 TS	2.500 000
I-2	taxonomie	LTDV-SASV-IPP-COP	1 TS	2.750 000
I-3	virulence	COP-SASV-ORSTOM		0
I-4	chimiothérapie	LTDV-SASV-COP		650 000
II-1	rétrospectif	LTDV-SASV		100 000
II-2	bassin	SASV-CREMA-ORSTOM		0
II-3	animaux à élever	SASV-LTDV		300 000
II-4	animaux en élevage	SASV-ORSTOM-COP-DRIM		300 000
II-5	suivi des élevages	LTDV-CIRAD-ORSTOM-SASV		0
Total :			2 TS	6.600 000

coûts opérationnels GIE RA				
thème :	type :	opérateurs :	poste :	fonctionnement. :
I-1	diagnostic	LTDV-CIRAD-SASV-URPIG		250 000
I-2	taxonomie	LTDV-SASV-IPP-COP		500 000
I-3	virulence	COP-SASV-ORSTOM		400 000
I-4	chimiothérapie	LTDV-SASV-COP	1 TS	0
II-1	rétrospectif	LTDV-SASV		0
II-2	bassin	SASV-CREMA-ORSTOM		0
II-3	animaux à élever	SASV-LTDV	1/3 TS	0
II-4	animaux en élevage	SASV-ORSTOM-COP-DRIM	1/3 TS	200 000
II-5	suivi des élevages	LTDV-CIRAD-ORSTOM-SASV	1/3 TS	100 000
Total :			2 TS	1.450 000

2-2 : discussion des acquis - modulation

2-2-1 : diagnostic de l'agent étiologique

1. confirmation diagnostique

ligne de programme I-1-1 : traitement des données acquises

Les individus malades ont une nage erratique, en surface et près des bords. Ils montrent souvent un corps sombre, des appendices et branchies rouge-orangés, quelquefois des tâches noires ("black spots") sur la carapace et un tube digestif généralement vide, et présentent des temps de coagulation augmentés. Enfin, la population des bassins affectés montre en règle générale une faible résistance au stress (mortalité importante lors de transfert, pêches partielles, etc...).

L'observation régulière de bactéries sur les individus malades nous a conduit à poser l'hypothèse d'une étiologie bactérienne (*Vibrio spp.*).

Les observations de coupes histologiques effectuées sur des crevettes malades de tous âges pêchées de Janvier 1994 à Janvier 1995 sur la plupart des bassins du Territoire ont permis de décrire le tableau anatomopathologique suivant :

- présence de nodules hémocytaires dans de nombreux organes et en particulier dans la glande digestive, les branchies, la paroi de l'estomac, le coeur, l'organe lymphoïde,
- présence régulière plus ou moins massive de bactéries,
- lésions de vacuolisation de l'organe lymphoïde généralement caractérisées par la présence de corps basophiles (inclusions cellulaires ou images de dégénérescence nucléaire). Ces images peuvent être observées dans d'autres organes (glande digestive en particulier...) chez les individus fortement lésés et sont généralement associées à la présence d'hémocytes picnotiques. Ces lésions ont pu être observées de façon très marquée sur des animaux ayant fait l'objet d'un stress à l'occasion d'une manipulation expérimentale.

ligne de programme I-1-2 : inventaire des agents pathogènes

L'examen direct des branchies révèle souvent une colonisation importante par des ciliés, notamment *Zoothamnium spp.*

Des algues de type cyanobactéries sont observées régulièrement sur certains sites d'élevage, associées parfois à des lésions de type entérite hémocytaire.

L'hémolymphe des individus malades - ou moribonds - est massivement colonisée par des bactéries mobiles observables au microscope à contraste de phase. Si les premiers points de ce tableau sont évocateurs de pathologies bactériennes (vibrioses notamment) observées par ailleurs en élevage de crevettes pénéides, le marquage moléculaire (ribotypes) de ces souches montre que des souches différentes, d'espèces différentes, interviennent au cours d'un même épisode de mortalité.

Les corps basophiles décrits plus haut pourraient être également évocateurs d'un phénomène toxique ou d'une pathologie virale. Des images analogues ont été décrites chez *Penaeus monodon* affectée par le Yellow Head Virus en Thaïlande. Des observations similaires mais repérées dans d'autres organes ont été décrites sous le nom de Taura Syndrome sur divers pénéides (*P. vannamei* et *P. stylirostris*) en Amérique du Sud, Centrale et Hawaii. Des observations en microscopie électronique ont été réalisées ; ces observations ont révélé la présence de structures intracellulaires de type Mollicutes. Des observations complémentaires sont menées afin d'explorer au niveau ultra structural la nature de ces lésions, et d'autres lésions éventuelles.

ligne de programme I-1-3 : établissement d'un tableau de correspondances

Compte tenu de ce qui précède et des incertitudes diagnostiques qui persistent, il est prématuré à l'heure actuelle de tenter d'établir ce tableau de correspondances. Toutefois, les lésions de l'organe lymphoïde, marquées par des images d'inclusions de nature basophile - dans la mesure où ces lésions sont considérées aujourd'hui comme prédominantes - pourraient constituer la base de ce tableau. La campagne d'échantillonnage prévue pendant la saison froide 1995, et son traitement au quatrième trimestre de l'année, devraient permettre d'avancer sur ce point.

2. taxonomie de l'agent pathogène

ligne de programme I-2-1 : identification des espèces bactériennes impliquées

Plusieurs centaines de souches ont été isolées à partir d'individus malades ou pêchées au hasard dans différents bassins du Territoire. Ces bactéries sont des *Vibrionaceae* pour l'essentiel. La caractérisation phénotypique (systèmes API et Biotype) d'une cinquantaine de souches représentatives a conduit à l'identification présumptive notamment de : *Vibrio alginolyticus*, et *V. harveyi*. Une étude génomique complémentaire faite en profils de gènes rRNA, sur une sélection d'une vingtaine de souches, a permis de confirmer l'identification de deux espèces de vibrions : *V. alginolyticus*, *mimicus* (atypiques) et *V. harveyi*.

ligne de programme I-2-2 : caractérisation phénotypique des souches isolées

La constitution de ce portoir est proposée dans la partie prospective de ce rapport, sur la base de l'identification des taxons de *Vibrio* identifiés en Nouvelle Calédonie et de leurs aptitudes métaboliques connues. Cependant, le travail préliminaire à cette étape (I-2-1), compte tenu du nombre important de souches isolées et de types ou « taxons » que ces souches représentent, n'est pas arrivé à son terme ; c'est pourquoi ce point de programme est aujourd'hui en attente.

ligne de programme I-2-3 : développement d'outils nouveaux de diagnostic

Rappelons que les épizooties chez les invertébrés marins, ont été souvent et sont encore étudiées essentiellement au travers de l'histologie et de la microscopie électronique qui bien que restant des techniques fondamentales présentent certaines limites. En effet, elles sont consommatrices de temps aussi bien pour la préparation des échantillons que pour leur observation. Elles sont par ailleurs relativement inadaptées à la quantification des infections du fait de la difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons et à détecter de faibles niveaux d'infection. Dans ce cadre, il est nécessaire aujourd'hui de développer de nouveaux outils de diagnostic. En effet, en pratique les maladies pourraient mieux être contrôlées si des analyses pouvaient être réalisées sur un grand nombre d'animaux à différentes étapes de production, mais également avant tout transfert d'envergure. De nouvelles techniques peuvent être attendues grâce aux progrès réalisés dans les domaines des biotechnologies et de la biologie moléculaire.

Il est important de rappeler, d'autre part, que ces animaux ne possèdent pas de lymphocytes B et de lymphocytes T, les cellules qui sont directement impliquées dans les réponses spécifiques vis à vis des agents pathogènes chez les vertébrés. Cette dernière particularité a des répercussions sur le diagnostic des pathologies chez les invertébrés. Du fait de l'absence d'anticorps spécifiques (produits par les cellules B chez les vertébrés en réponse à une infection donnée), le diagnostic ne peut être qu'un diagnostic direct chez les invertébrés marins. C'est à dire qu'il est nécessaire de rechercher directement l'agent pathogène en cause et non une trace de sa présence. Dans ce cadre, un ensemble de techniques existant pour mettre en évidence les agents pathogènes chez les vertébrés nous est inaccessible et rend le diagnostic des pathologies chez les invertébrés marins plus difficile à mettre en oeuvre.

Ces outils (anticorps mono ou polyclonaux ou sondes ou empreintes DNA, cf annexe n° 1) n'ont d'intérêt que dans la mesure où ils permettent le diagnostic d'un agent pathogène avéré. Cette ligne de programme, on le comprend, est assujettie aux résultats de la démarche diagnostique qui précède.

3. étude de virulence

ligne de programme I-3-1 : reproduction expérimentale de la maladie

Du fait de l'impossibilité de stimuler des mécanismes immunitaires spécifiques inexistant, l'approche la plus prometteuse semble être l'obtention d'animaux « tolérants » à certaines pathologies. La reproduction expérimentale d'une maladie au laboratoire ouvre la voie à la sélection par le biais de la génétique quantitative. Mais également des travaux concernant les mécanismes de défense mis en jeu par les animaux vis à vis d'infections peuvent aboutir à la définition de traceurs de résistance utilisables dans une stratégie de sélection ou une stratégie de transgénèse (ce qui aujourd'hui, précisons le, relève encore de la science fiction).

Le rôle étiologique de ces bactéries en tant que facteur déterminant ou aggravant est en cours d'étude. Le pouvoir pathogène des souches bactériennes isolées par injection intra musculaire à des crevettes saines a été étudié. Celui-ci s'avère parfois redoutable. Citons la DL50 de l'ordre de 35 CFU pour la souche AM23. Le rôle étiologique de ces bactéries en tant que facteur déterminant ou aggravant est en cours d'étude.

D'autre part, compte tenu de la suspicion d'une origine virale ci-dessus mentionnée, des essais de reproduction expérimentale de la maladie ont été entrepris par baignation ou injection d'un ultra-filtrat de crevettes mourantes prélevées au cours d'épisodes aiguës et stockées au froid, à -70°C. Ces expériences devraient permettre de mesurer le pouvoir pathogène d'entités ultrafiltrables (virus, toxines) présentes chez les individus atteints.

Deux agents pathogènes (apparemment de natures différentes, souches de *Vibrio* AM23 et Z1 et entités ultrafiltrables) nous permettent donc aujourd'hui d'appliquer les postulats de Koch concernant la démonstration d'une pathogénie.

ligne de programme I-3-2 : étude *in vitro* de facteurs de virulence

La caractérisation du pouvoir pathogène des bactéries en cause est complétée par une étude *in vitro*, notamment sur lignée cellulaire. Des cellules de crevettes en culture ont été utilisées. Les capacités d'adhésivité des bactéries sont testées sur tapis confluant, après un délai de contact entre suspension bactérienne de densité ajustée et tapis cellulaire, et rinçages au PBS. L'analyse des relations entre les bactéries et les cellules sera faite en microscopie optique après coloration de type Giemsa (ou MGG), et en microscopie électronique à transmission.

L'activité cytotoxique de surnageants de cultures bactériennes ainsi que de lysats bactériens a été testée de même sur cultures de cellules (KB). les modifications du tapis cellulaire en plaque P 96 sont examinées. Notamment, la survie des cellules est révélée par l'incorporation de rouge neutre par celles-ci, élimination du milieu de culture et lecture en densité optique du tapis après lyse des cellules au SDS. Ces recherches se sont avérées négatives pour les souches de *Vibrio* isolées de crevettes. Ce résultat serait cependant à confirmer si l'hypothèse bactérienne était maintenue.

4. chimiothérapie :

ligne de programme I-4-1 : sélection de molécules actives

En fait, cette sélection est d'abord et avant tout bibliographique ; trois antibiotiques sont ainsi retenus sur la base notamment d'un agrément administratif, et qui sont l'OTC, le Romet® et le Sarafin®. Le choix d'une molécule est en outre établi à partir des données de sensibilité des souches de bactéries à la molécule envisagée. Ces données sont obtenues sur quelques souches isolées en élevage et pour lesquelles sont réalisés antibiogrammes et mesures de CMI. Le Romet® et le Sarafin® semblent potentiellement utilisables. Un nombre insuffisant d'antibiogrammes et de CMI ont pour l'instant été réalisés.

ligne de programme I-4-2 : application du modèle expérimental

Le modèle expérimental développé à l'aide de souches bactériennes associées au syndrome 93 permet d'obtenir des éléments de référence quant à l'efficacité des molécules envisagées. Ces essais montrent un certain intérêt du Romet® dans la protection des animaux. Toutefois ces résultats doivent être considérés comme préliminaires et l'aménagement d'une zone spécialement prévue à cet effet au COP devrait permettre d'affiner les premiers résultats obtenus.

ligne de programme I-4-3 : essais terrain de molécules

Compte tenu des contraintes de tels essais en grandeur nature, une seule et unique molécule pouvait être raisonnablement testée ; notre choix compte tenu de l'actif de cet antibiotique s'est porté sur l'OTC^d.

Notre approche expérimentale devait tenir compte du peu de données relatives à l'utilisation de l'OTC en pénéculture tropicale. Le taux d'incorporation de la molécule à l'aliment a été mesuré par dosage de la molécule en méthode spectrophotométrique à partir d'une quantité connue d'aliment. L'aliment médicamenteux préparé a été testé vis-à-vis de sa tenue à l'eau par dosage en HPLC de l'antibiotique dans l'eau où séjourne l'aliment maintenu dans une étamine ; la mesure étant faite à intervalles de temps successifs. La consommation de l'aliment a été évaluée au cours des traitements de bassins par recherche de restes sur le fond des bassins ou sur plateaux mangeoires. En unité expérimentale, sur fond artificiel, la consommation était également suivie. Le taux d'incorporation de l'OTC par les animaux a été évalué par dosage de l'OTC dans divers tissus en méthode HPLC.

Un certain nombre de lots d'animaux ont subi un traitement à l'OTC, soit en bassin de grossissement, soit en unité expérimentale ; les taux de survie de ces lots sont comparés à ceux de lots témoins non traités et élevés

^d Les données de sensibilité *in vitro* des souches Z1 et AM23 à l'OTC réalisées récemment au COP nous conduiraient aujourd'hui à éliminer cet antibiotique de notre arsenal thérapeutique.

dans des conditions égales par ailleurs. La résistance des animaux à un stress a été envisagée comme critère d'évaluation de santé. D'autre part, une évaluation de la bactériémie des animaux a été réalisée par la mise en culture d'un goutte d'hémolymphe. Le traitement était appliqué conformément aux recommandations de divers auteurs pendant une période de 10 jours, suivie d'une nouvelle période de 10 jours à quelques semaines d'intervalle. Un temps d'attente de 21 jours était recommandé avant abattage des animaux destinés à la consommation humaine.

Des prélèvements de sol et d'eau au cours de ces traitements ont été faits afin de pouvoir mesurer les quantités d'OTC dans ces compartiments des bassins ; les mesures sur ces échantillons ne sont pas encore disponibles.

Ces essais ont donc montré la difficulté de fabriquer un aliment médicamenteux de qualité. Il est difficile de conclure sur la question de l'efficacité du traitement par l'OTC mais il apparaît clairement que la consommation d'un aliment médicamenteux constitue un point de blocage du traitement, soit du fait de basses températures, soit du fait de la maladie elle-même. Ces expériences montrent le bien fondé des limites énoncées au préalable des possibilités de traitement en aquaculture. Ces essais ont enfin montré le manque de cohésion, de responsabilisation et de maturité de la filière.

Des vaccins et immunostimulants ont été testés au cours de la saison chaude et ne semblent pas procurer de protection des animaux. Quoiqu'il en soit, la vaccination au sens conventionnel du terme, reste sans objet chez les pénéides du fait de leur absence de réponse immune spécifique. En effet, ces animaux ne possèdent pas de lymphocytes B et de lymphocytes T, les cellules qui sont directement impliquées dans les réponses spécifiques vis à vis des agents pathogènes chez les vertébrés et qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination.

2-2-2 : identification des conditions favorisantes

1. état des techniques de production

ligne de programme II-1-1 : enquête rétrospective

La mortalité observée dans les élevages de pénéides apparaît sous forme de flambées épizootiques brèves (plusieurs centaines d'animaux morts chaque jour en bord de bassin) souvent associées à des pics de mue, des variations de température, de salinité, etc... Les taux de survie anormalement faibles obtenus sur les derniers cycles d'élevage laissent supposer une mortalité chronique pouvant passer inaperçue. L'enquête zootechnique rétrospective, en cours de réalisation, devrait permettre de décrire les épisodes observés et essayer de formuler des hypothèses de facteurs de risque.

A l'heure actuelle, les données de l'enquête sont en cours de saisie informatique et d'harmonisation de système informatique. Les premiers traitements statistiques (de type corrélations) devraient permettre rapidement une étude descriptive.

2. qualification du bassin

ligne de programme II-2-1 : quantification du flux d'azote entre les divers compartiments
données non disponibles

ligne de programme II-2-2 : caractérisation des bassins au cours des différentes phases d'élevage
données non disponibles

ligne de programme II-2-3 : optimisation des pratiques de jachère ou d'assecs
données non disponibles

ligne de programme II-2-4 : influence des sols enrichis sur déclenchement de la maladie
données non disponibles

3. qualification de l'état originel des animaux

ligne de programme II-3-1 : élevage de post-larves issues de nauplii/géniteurs sélectionnés

Parmi les façons de protéger efficacement les crevettes pénéides vis à vis des maladies infectieuses on peut rappeler : mettre au point des techniques de diagnostic sensibles et fiables, contrôler certains paramètres du milieu d'élevage, ainsi que d'obtenir des populations d'animaux présentant une « résistance » à certaines maladies. Ce sont ces voies que nous avons tenté de développer dans notre approche du syndrome 93.

Les travaux menés en pathologie expérimentale ouvrent la voie à la sélection par le biais de la génétique quantitative. En l'absence d'un modèle satisfaisant, il peut cependant être envisagé une amélioration génétique à l'aide d'une « pression » de sélection, naturelle, exercée sur le terrain par le pathogène lui-même. C'est pourquoi, l'élevage de post-larves issues de nauplii et de géniteurs sélectionnés est envisagé.

ligne de programme II-3-2 : mise en élevage de post-larves obtenues sans antibiotiques

Des élevages larvaires ont été réalisés à l'écloserie de la SASV, à Paris et à l'écloserie de la SASVI, sans antibiotique (furazolidone). Les élevages ont été satisfaisants et comparables ; d'autre part, les post larves issues de ces élevages et mise en grossissement dans deux bassins de la SASVI ont donné des résultats identiques. Cette expérience préliminaire demanderait à être répétée en conditions plus stringentes pour les animaux dans la mesure où les élevages menés en saison chaude n'ont pas subi de pression de la part du syndrome 93.

ligne de programme II-3-3 : mise en élevage de post-larves d'autres espèces pénéides

Cette expérience a pour but d'envisager une espèce de substitution pendant la seule période hivernale^d, critique semble-t-il pour *P. stylirostris*. Le choix de cette espèce a porté sur *P. indicus*. Un lot d'animaux a été importé sur le Territoire depuis le COP, après contrôle sanitaire. Ces animaux ont été placés en zone de quarantaine à la SASV dont elles devraient sortir compte tenu d'un récent contrôle satisfaisant des animaux (C. Goarant, communication personnelle).

Cette zone de quarantaine devrait permettre de recevoir rapidement un lot d'animaux SPR43 en provenance du COP.

ligne de programme II-3-4 : critères de qualité des post-larves à l'ensemencement

Tous les écloveurs sont intéressés par une évaluation de la qualité des larves ou des post-larves qu'ils produisent. Cette connaissance constitue un argument de vente considérable : pouvant garantir à leurs clients des rendements ou des survies supérieurs à ceux de la concurrence, ils sont assurés de mieux vendre leur production avec des marges plus confortables. En outre, pouvant mesurer les effets de leurs choix techniques ils peuvent progresser plus vite et développer leur productivité.

Partant du postulat qu'une post-larve en parfaite condition physiologique, donc de bonne qualité, résistera mieux à un stress physiologique, divers auteurs ont proposé d'évaluer les conséquences d'une chute brutale de la salinité sur la survie des produits de l'écloserie.

Tackaert *et al.* (1989) ont ainsi mis en évidence des différences de survie chez des post-larves de *P. monodon* qui avaient été nourries d'artémies supplémentées ("boostées") par des aliments riches en acide gras polyinsaturés. Le même test a été utilisé, soit au niveau expérimental (Baybay, 1989, Nietes, 1990, Briggs et Brown, 1991) soit à un niveau commercial (Baumann et Jamandre, 1990) chez *P. monodon*. Il a été utilisé dès 1988 au COP et en Equateur dans les écloséries commerciales sur *P. vannamei* (Maugle, 1988).

Le principe général du test est très simple : Villalon (1991) recommande de transférer directement des bacs d'élevage, les post-larves de *P. vannamei* par lots de 100 individus dans une eau à 5‰ de salinité. Les essais sont réalisés en triplicats. La survie est évaluée au bout d'une heure, si elle est inférieure à 60% les post-larves doivent être rejetées.

^d les limites de cet essai ont été clairement données lors de la réunion du Comité Mixte d'Octobre 1994, où ce point avait longuement été discuté.

Aquacop *et al.* (1992) cherchant à modéliser la résistance aux chocs de salinité des post-larves de *P.vannamei* ont utilisé une gamme de stress consistant à transférer les post-larves par lots de 50 individus dans des récipients contenant de l'eau de 5 à 20‰.

Dans tous les cas, la mortalité est évaluée par le comptage des individus immobiles et ne réagissant pas à une stimulation mécanique.

Quelques auteurs ont préféré associer le stress de salinité à un second stress :

- Baumann et Jamandre (1990) associer une diminution brutale de la salinité de 15‰ à un bain de formol à 100ppm pendant deux heures;
- Nietes (1990) ajoute une chute de la température au choc de salinité en maintenant les post-larves pendant une heure à 5‰ et 20°C;
- Clifford propose d'utiliser de façon standardisée une chute simultanée de la salinité à 20‰ et de la température à 10°C pendant 4 heures pour inclure la mortalité tardive.

Parmi les crustacés, les pénéides peuvent être considérés comme de puissants osmorégulateurs. Cette caractéristique est liée à leur biotope : la plupart passent en effet la plus grande partie de leur vie, toute la phase juvénile dans les eaux côtières et, plus particulièrement les estuaires. Les pénéides sont donc adaptés à des milieux extrêmement variables dont la salinité peut aller de quelques grammes pour mille à plus de 40‰. La ponte se produit en mer, à salinité normale. Les larves ont des capacités d'osmorégulation très restreintes, légèrement hypertoniques. Elles sont décrites comme osmoconformes (Charmentier, 1986). La régulation hyper-hypo-osmotique se met en place progressivement après la métamorphose: (Charmentier *et al.*, 1988). Bouaricha (1990) a montré chez *P.japonicus* à l'aide de tests similaires à ceux qui ont été évoqués plus haut que la salinité létale à 50% (SL50) à 24 heures passait de 20‰ pendant la phase larvaire à 25‰ pendant la métamorphose puis diminuait progressivement au cours du développement de la post-larve. La capacité osmorégulatrice peut être considérée comme complète après une quinzaine de jours chez cette espèce au stade post-larvaire PL-8.

L'analyse des résultats des tests réalisés par Aquacop *et al.* (1992) met de même en évidence une résistance de plus en plus forte des post-larves de *P.vannamei* qui passe de 0% de survie à 20‰ 2 jours après la métamorphose à près de 100% lorsqu'elles mesurent 7.5 mm de longueur 18 jours plus tard.

Il faut préciser ici qu'une certaine confusion existe dans la littérature sur la définition précise du stade post-larvaire. Charmentier (1986) et Bouaricha (1990) établissent une distinction précise entre stade post-larvaire PL-N, identifié sur critères morphologiques et P-N crevettes qui se sont métamorphosées depuis N jours. Cette dernière classification des post-larves a le mérite d'être simple d'emploi - notamment en éclosion industrielle - mais ne rend pas compte de l'état de développement des post-larves. Les observations qui viennent d'être rapportées donnent à penser que les stress de salinité mesurent plus l'état de développement des post-larves que leur état physiologique, leur qualité.

Il apparaît même nécessaire de s'interroger sur la pertinence du terme de stress appliqué à ces chocs osmotiques chez les post-larves âgées d'une quinzaine de jours : leur réponse à ces chocs est dans l'ordre normal des choses car elles sont biologiquement adaptées à un environnement très variable. Ils ne provoquent pas de souffrance physiologique majeure.

Samocha et Lawrence (1992) ainsi que Clifford (1992) considèrent encore le test de salinité comme un bon moyen d'évaluation de la qualité des produits d'éclosion mais le dernier auteur insiste particulièrement sur le fait que les résultats des tests seront d'autant meilleurs que les post-larves seront grandes; il recommande d'attendre PL 8-10 pour *P.vannamei*, PL 6-10 pour *P.stylostris*, et PL 15-25 pour *P.monodon*.

L'analyse de Fegan (1992) sur le sujet apparaît, en revanche, beaucoup plus critique. Cet auteur remarque en particulier que la résistance de *P.monodon*, espèce très euryhaline, est trop importante pour que le test présente une quelconque utilité en contrôle de qualité à partir de PL 10. Par ailleurs, la démonstration expérimentale d'un effet de l'alimentation sur la résistance au stress (Tackaert *et al.*, 1989) peut être attribuée à un développement accéléré des post-larves mieux nourries. Enfin, il constate qu'à ce jour aucune relation entre les résultats des tests et les performances en élevage n'a pu être démontrée.

Si ce test reste utile dans la vérification de la capacité adaptative de post-larves destinées à une immersion dans des eaux très dessalées, il apparaît clairement que la résistance aux stress de salinité, ne constitue pas un critère

de qualité (au sens large) des produits d'une éclosure de crevettes, en premier lieu parce que la notion de stress y apparaît discutable, en second lieu parce que la méthode n'a pas fait la preuve de son utilité dans une relation entre la mesure effectuée à l'immersion et les résultats de l'élevage proprement dit.

4. qualification de l'état des animaux en cours d'élevage

ligne de programme II-4-1 : mise au point de tests de viabilité des animaux

La résistance des animaux à un stress est envisagée comme critère d'évaluation de santé. Ce test intervient notamment dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité du traitement des animaux par l'OTC.

Les animaux sont capturés à l'épervier dans le bassin d'élevage puis transférés par lots d'environ 20 individus en bassin de scobalite (unité expérimentale) où l'eau est continuellement renouvelée et aérée. Les animaux sont nourris de façon fractionnée. Les observations sont faites régulièrement dans les jours qui suivent le transfert et les animaux morts sont relevés. Le stress correspond à la sommation de la capture, transfert, eau claire, nature du fond, etc...il s'agit d'un stress complexe. Le test est conduit pendant une semaine avant sacrifice des animaux survivants.

Quoique simple, il semble que ce type de manipulation constitue un bon indicateur de l'état d'un bassin d'élevage. Ce test pourrait être couplé à des mesures de capacité osmoréglatrice des animaux, dans une phase de validation de cette méthode.

ligne de programme II-4-2 : mesure des capacités d'adaptation des animaux

Les travaux menés au COP montrent que des mesures de la capacité osmoréglatrice des animaux permettent d'évaluer leurs capacités d'adaptation. La relation, en conditions expérimentales, entre cette capacité osmoréglatrice des animaux et le taux d'oxygène dissout dans l'eau est très démonstrative : cette capacité diminue sensiblement et la réponse des animaux est rendue très hétérogène pour des valeurs d'O₂ inférieures à 3ppm. Ces résultats confirment les données terrain obtenues lors d'une première mission en Nouvelle-Calédonie (Aquacop *et al.*, 1994).

Cependant, il s'agit moins d'un outil de terrain que d'un indicateur de laboratoire qui permette d'explorer de façon satisfaisante la notion de stress. Cet outil devrait être utilisé dans cet esprit (cf partie 5-1-3).

ligne de programme II-4-3 : évaluation de l'immunocompétence des animaux

L'étude globale du syndrome 93 n'est pas aujourd'hui assez avancée pour permettre le démarrage de cette partie de programme et l'implication de l'équipe IFREMER DRIM. L'avancement du travail de mise au point d'un modèle expérimental au laboratoire pourrait cependant, à terme, ouvrir la voie de travaux concernant les mécanismes de défense mis en jeu par les crevettes vis-à-vis d'infections, notamment bactériennes, et pourrait aboutir à la définition de traceurs de résistance utilisables dans une stratégie de sélection.

ligne de programme II-4-4 : recherche d'indicateurs de mortalité

L'estimation de la survie ou de la mortalité pouvant survenir au cours de la période de grossissement est bien entendu cruciale. Elle est d'autant plus importante que la situation est celle d'un taux de mortalité anormalement élevé. La difficulté principale réside dans la taille des lots d'animaux élevés, la surface des bassins, la turbidité de l'eau notamment en fin d'élevage et de phénomènes de cannibalisme. L'évaluation de taux et du mode de mortalité est cependant nécessaire.

Des essais d'évaluation de la mortalité sont réalisés à partir d'observations faites en plongée sur cadres posés au fond, corrélés aux observations plus classiques sur mangeoires, sur le fond, par évaluation des restes alimentaires et comptage des cadavres sur le bord des bassins. Ces essais sont menés de façon pilote à la SASV.

5. suivi des élevages

ligne de programme II-5-1 : enquête écopathologique

Cette enquête a été conçue et menée dans le cadre d'un travail de thèse (Mlle Mermoud, CIRAD). Ce volumineux travail en est à la fin de sa deuxième année et devrait être analysé au cours des mois qui viennent. La démarche écopathologique pourrait cependant trouver une limite en l'absence de cas témoin généralement inclu dans ce type d'étude.

ligne de programme II-5-2 : réalisation des bilans d'azote données non disponibles

ligne de programme II-5-3 : stimulation et contrôle du phytoplancton

Ce point de faiblesse de nos élevages (Frelier, 1994) avait été mis en exergue à diverses reprises. Des expériences d'engraissement des bassins sont en cours. Les résultats préliminaires sont disponibles qui montrent la possibilité d'installer et surtout de maintenir un bloom phytoplanctonique satisfaisant.

ligne de programme II-5-4 : suivi des eaux d'arrivée de différentes fermes

Ce suivi est réalisé sur les sites d'Aquamon, Seafarm et SASV, selon un rythme hebdomadaire. Différents paramètres sont pris en compte pour ce suivi, notamment dosage de la chlorophylle, matières en suspension, microbisme. Ce suivi doit être mené sur une période suffisamment longue avant analyse.

ligne de programme II-5-5 : suivi de l'évolution des paramètres du sol données non disponibles

Remarque : un grand nombre de résultats non disponibles aujourd'hui prendront place dans les fiches biotechniques ou de coordination de la SASV.

3^{ème} partie : Etiologie du syndrome 93

Cette partie présente le détail des résultats de la démarche diagnostique du syndrome 93 ; les éléments qui y figurent ont déjà fait l'objet d'une présentation succincte, reprise ici en guise d'introduction.

La mortalité observée dans les élevages de pénéides, apparaît sous forme de flambées épizootiques brèves (plusieurs centaines d'animaux morts chaque jour en bord de bassin), souvent associées à des pics de mue, des variations de température, de salinité, etc... Les taux de survie anormalement faibles obtenus sur les derniers cycles d'élevage laissent supposer une mortalité chronique pouvant passer inaperçue. L'enquête zootechnique rétrospective en cours de réalisation devrait permettre de décrire les épisodes observés et de formuler des hypothèses de facteurs de risque.

Les individus malades présentent un tableau clinique relativement frustré (nage anormale, modifications de la pigmentation, anorexie, etc...). La population des bassins affectés montre en règle générale une faible résistance au stress (mortalité importante lors de transfert, ou de pêches partielles).

L'hémolymphe des individus malades est massivement colonisée par des bactéries. L'observation régulière de bactéries sur les individus malades a conduit à entreprendre leur identification. Plusieurs centaines de souches ont été isolées à partir d'individus malades ou pêchés au hasard dans différents bassins du Territoire. Ces bactéries sont des *Vibrionaceae* pour l'essentiel. La caractérisation phénotypique d'une cinquantaine de souches a conduit à l'identification présomptive de *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, et *Aeromonas hydrophila*. Une étude génomique complémentaire sur une sélection d'une vingtaine de souches a permis de confirmer l'identification des espèces de vibrions suivantes : *V. alginolyticus*, *mimicus*, et *harveyi*. Par typage moléculaire, cette étude montre en outre que des souches différentes, d'espèces différentes, peuvent intervenir au cours d'un même épisode de mortalité.

Les observations de coupes histologiques effectuées sur des crevettes malades sur la plupart des bassins du Territoire ont permis de décrire les lésions anatomopathologiques suivantes :

- présence de nodules hémocytaires dans de nombreux organes,
- présence régulière plus ou moins massive de bactéries,
- lésions de l'organe lymphoïde généralement caractérisées par la présence de corps d'inclusions intra-cellulaires basophiles ou images de dégénérescence nucléaire.

Si les premiers points du tableau sont caractéristiques des pathologies bactériennes (vibrioses notamment) observées en d'autres élevages de crevettes pénéides, les corps basophiles décrits ci-dessus pourraient être également évocateurs d'un phénomène toxique ou d'une pathologie virale. Des images analogues ont été décrites chez *Penaeus monodon* affectée par le Yellow Head Virus en Thaïlande. Des observations similaires mais repérées dans d'autres organes ont été décrites sous le nom de Taura Syndrome sur divers pénéides (*P. vannamei* et *P. stylirostris*) en Amérique du Sud, Centrale et Hawaïi (cf partie 1-2-3 de ce document).

Des observations en microscopie électronique ont été réalisées ; ces observations ont révélé la présence de structures intracellulaires de type Mollicutes. Des observations complémentaires sont actuellement menées afin d'explorer au niveau ultra structural la nature de ces lésions, et d'autres lésions éventuelles.

Le rôle étiologique des souches bactériennes isolées (*Vibrio spp.* essentiellement) en tant que facteur déterminant ou aggravant sont en cours d'étude. Le pouvoir pathogène de ces bactéries par injection intra musculaire à des crevettes saines s'avère parfois redoutable. Citons la DL50 de l'ordre de 35 CFU pour la souche AM23. D'autre part, compte tenu de la suspicion d'une origine virale ci-dessus mentionnée, des essais de reproduction expérimentale de la maladie ont été entrepris par balnéation ou injection d'un ultra-filtrat de crevettes mourantes prélevées au cours d'épisodes aigus et stockées à -70°C. Ces expériences devraient permettre de mesurer le pouvoir pathogène d'entités ultrafiltrables présentes chez les individus atteints.

3-1 : données histologiques

3-1-1 : le stress comme facteur déclenchant une mortalité

Une expérience a été menée à la SASV, qui consistait en un essai de déclenchement de mortalité consécutif à un stress simple (transfert des animaux).

Quatre cent cinquante animaux sont capturés à cette fin à l'épervier dans le bassin d'élevage numéro 10 de la SASV 2, puis transférés en unité expérimentale où l'eau est continuellement renouvelée et aérée. Les animaux sont nourris de façon fractionnée. Les observations et relevés de mortalité sont faits quatre fois par jour. Le stress correspond en fait à la sommation de la capture, du transfert, de la mise en eau claire, de la nature du fond, etc... C'est un stress complexe. Le test est conduit pendant dix jours après transfert.

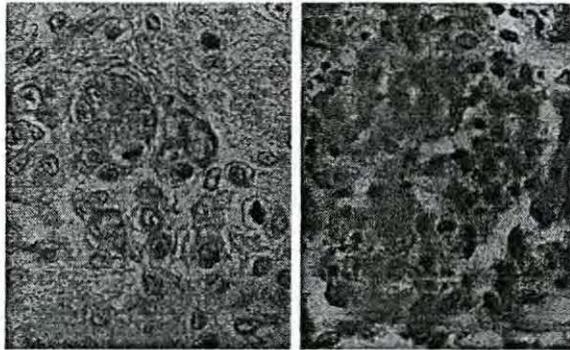
Des prélèvements pour bactériologie (dénombrements bactériens) et histologie sont réalisés à intervalles réguliers sur trente individus capturés : à 10, 20 et 48 heures après transfert (séries d'animaux B, C, et D). Par ailleurs, trente animaux sont prélevés directement dans le bassin afin de constituer un lot de référence (série A). Les échantillons histologiques correspondant à cette manipulation ont été traités au Laboratoire de Pathologie du COP et analysés lors d'une mission à l'URPIG (Berthe (b), 1994).

Cent vingt lames histologiques sont préparées (elles correspondent aux animaux prélevés lors de cette expérience fixés par moitié en Davidson et Carson). Les tissus conservés en Davidson ont été traités en histologie classique, coloration H&E, les tissus fixés en Carson étaient quant à eux destinés à d'éventuels traitements en vue d'observations en microscopie électronique à transmission (MET).



cliché n° 1 : nodule hémocytaire dans la glande digestive de l'animal C3 (coloration hémalum éosine).

L'observation de ces lames révèle un certain nombre de lésions décrites par ailleurs, à savoir : présence de nodules hémocytaires (cf cliché n° 1), picnose nucléaire et présence de rares bactéries. L'observation des coupes histologiques révèle, d'autre part, chez certains individus la présence de corpuscules basophiles de taille variable, fréquemment inférieure à celle du noyau (cf clichés n° 2 et 3). Ces corpuscules sont généralement observables dans les organes lymphoïdes et hématopoïétiques. Cependant, un certain nombre d'animaux particulièrement affectés présentent ce type d'anomalie en divers tissus, hépatopancréas, branchies, muscle, etc...



cliché n° 2 : organe lymphoïde sain, avec images de mitoses (H&E, animal D22) ; *cliché n° 3* : organe lymphoïde présentant de nombreuses images de corpuscules basophiles (H&E, animal C1).

Ces anomalies cellulaires pourraient correspondre à des condensations nucléaires ou à des inclusions. Ces lésions, observées par ailleurs (R. Costa, communication personnelle, 3-1-2), marquent ici par leur importance, que contrastent la présence anecdotique de bactéries ainsi que la parcimonie des nodules hémocytaires. Certains individus observés présentent des lésions massives de l'organe lymphoïde. Ces images peuvent être observées dans d'autres organes (glande digestive en particulier...) chez les individus fortement lésés. Ces lésions peuvent être associées notamment à l'action de certaines toxines bactériennes, ou à des infections virales. Un travail de caractérisation de ces inclusions (notamment par colorations spécifiques, selon la technique de Feulgen) permet de préciser la nature de leur contenu, riche en ADN.

L'image qui se dégage de ces observations réalisées sur les cent vingt lames, préparées dans le cadre de cette expérience, est celle d'une lésion prédominante d'inclusions basophiles, principalement dans les organes lymphoïdes et hématopoïétiques des animaux de la série C (soit 20 heures après transfert). Les relevés de mortalité, enregistrée après transfert, montrent un maximum compris entre 20 et 48 heures post transfert.

Ce type de lésion n'est en général pas décrit dans les affections à *Vibrio* (Mohney *et al.*, 1994), tableau duquel la quasi absence de bactéries et la rareté de nodules hémocytaires contribuent à se démarquer (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994). Lors d'un épisode de sépticémie bactérienne sur des juvéniles de *P. monodon*, il a été décrit dans l'organe Y une augmentation de la basophilie due à des amas de débris de noyaux caryorectiques (Anderson *et al.*, 1988). La production de toxines par des bactéries, un processus inflammatoire pourraient conduire à ces désordres.

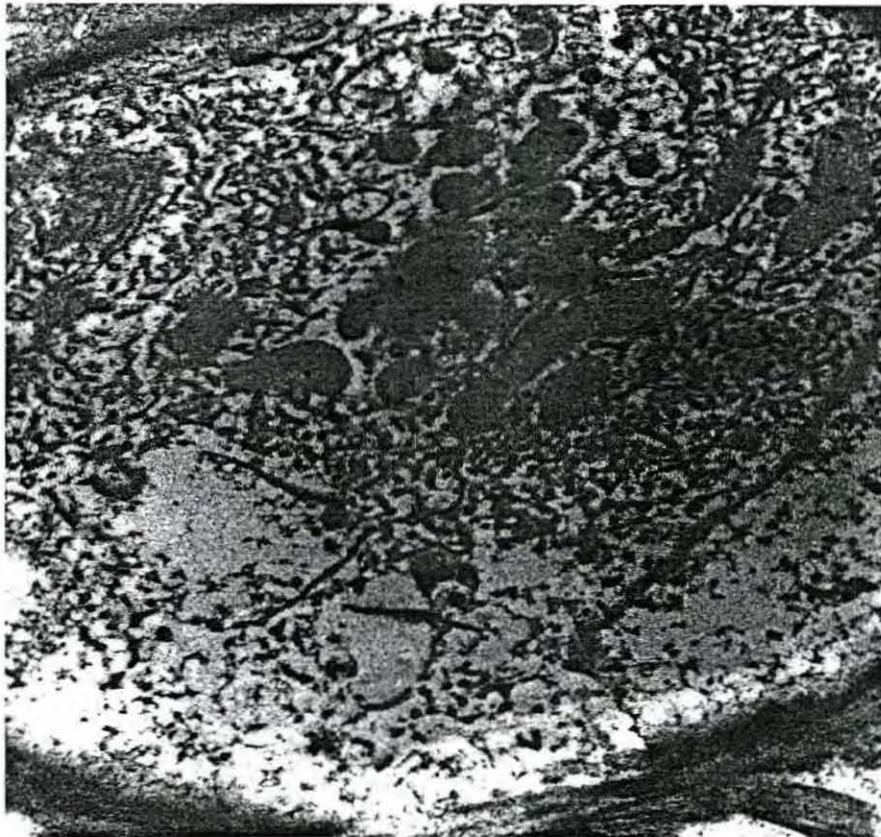
Nous avons évoqué la possibilité d'une origine virale de ces lésions de l'organe lymphoïde, et nos observations semblent en effet correspondre à la description et aux clichés photographiques des lésions de l'organe lymphoïde associées à la présence de particules virales chez *P. monodon* (Flegel *et al.*, 1992). Les lésions observées dans notre cas ne sont pas pathognomoniques mais permettent de formuler des hypothèses quant à leur étiologie. Des lésions de l'organe lymphoïde ont été décrites dues à différents types de virus, picorna ou reo, parvo-like, etc... (Flegel *et al.*, 1992). Une étude de Bergh *et al.* (1989), par ailleurs, met en lumière la sous-estimation fréquente de la quantité des particules virales dans les environnements aquatiques lorsqu'elle est évaluée par des méthodes classiques ; la quantité de virus peut être de 10^3 à 10^7 fois plus importante en effet.

La conservation des tissus par demi animal en liquide de Carson nous permettait d'envisager l'observation de lésions en MET. Les pièces qu'il est choisi d'observer sont rincées en tampon cacodylate. Les échantillons sont ensuite traités selon la séquence suivante : fixation en glutaraldéhyde, post-fixation à l'acide osmique, déshydratation puis imprégnation et inclusion en résine Epon. Les coupes sont réalisées sur un microtome NOVA LKB. Les coupes semi-fines sont colorées au Bleu de Toluidine et observées en microscopie photonique. Les coupes ultra-fines sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200 EX. Des clichés photographiques sont faits à l'occasion de ces observations. L'observation des coupes histologiques et la lecture des coupes semi-fines permet le repérage des animaux et des lésions à observer. Le choix des échantillons à observer repose essentiellement sur l'importance des lésions relevées en histologie classique, ce critère conditionne en effet la probabilité de retrouver ces lésions lors de l'observation des grilles pour MET.

L'étude ultrastructurale d'un nodule hémocyttaire qu'il nous a été donné d'observer (animal C3) montre la participation d'hémocytes au processus d'encapsulation, agrégés en couches minces successives concentriques. Certains de ces hémocytes contiennent un nombre variable de granules. L'observation de cette lésion à différents

niveaux de coupe n'a pas permis de mettre en évidence la présence de particules étrangères ou d'agent pathogène.

Certaines cellules caryorectiques repérées sur coupe semi-fine montrent des images de noyaux anormaux, avec condensations de chromatine ; certaines zones cellulaires révèlent la présence d'éléments vermiformes en amas de filaments, parfois ramifiés, que la coupe présente sous forme de sections longitudinales ou perpendiculaires au grand axe d'une structure concentrique. Ces éléments peuvent figurer des organismes de type Mollicutes (cliché n° 4).



cliché n° 4 : zone cellulaire révélant la présence d'éléments vermiformes en amas de filaments, pouvant figurer des organismes de type Mollicutes.

L'observation en MET de structures étrangères aux cellules ne doit pas nous faire oublier l'extrême réserve à laquelle nous oblige une unique observation sur une préparation à partir d'un individu prélevé en conditions expérimentales (crevette C3). Des structures vermiformes analogues ont été observées chez *P. vannamei* et interprétées comme étant des mollicutes (Krol *et al.*, 1991) et plus récemment chez *P. japonicus* (D. L. Choy, communication personnelle). Ces microorganismes (filamenteux mollicute-like bacterium) ont une localisation intracellulaire qui pourrait expliquer les inclusions basophiles observées en microscopie optique. Leur description sous forme de masses de filaments remplissant le cytoplasme de certaines cellules, absence de paroi et aspect bourgeonnant de ces structures peut correspondre à nos observations en MET. De plus amples études ultrastructurales sont nécessaires (entre autres à partir d'échantillons correspondant à des épisodes naturels de mortalité) afin de préciser la nature des éléments observés. Précisons que dans la mesure où cette observation reste ponctuelle (et pourrait à ce titre être parfaitement anecdotique), il est important de pouvoir préciser son incidence dans le cadre du syndrome 93 (cf partie 5 de ce document).

La littérature fait état d'un nombre croissant d'observations d'infections à rickettsies, chlamydie et mollicutes, quoique le pouvoir pathogène de ces organismes ne soit pas établi clairement et parfois discuté (J. R. Bonami, communication personnelle). L'étude du Texas Pond Mortality Syndrome (TPMS), Krol *et al.*, 1991, a montré la présence simultanée de mollicutes de formes filamenteuses et spiralées et de rickettsies dans l'hépatopancréas

des animaux atteints. Les cellules de la glande digestive contenaient des quantités importantes de ces organismes libres dans le cytoplasme. Les lésions de l'hépatopancréas (TPMS) induisent une réduction de la consommation d'aliments, un ralentissement de croissance, une certaine léthargie puis la mort. Ces affections ont été fréquemment doublées de sur-infections bactériennes des tissus hépatopancréatiques nécrotiques ; l'intercurrence possible avec d'autres agents pathogènes a été montrée : virus MBV, HPV, REO, bactéries, algues et protozoaires (Anderson *et al.*, 1988, Krol *et al.*, 1991).

3-1-2 : histologie des prélèvements faits sur les fermes

Les individus malades présentent en général des appendices et branchies rouge-orangés, quelquefois des taches noires ("black spots") sur la carapace et un tube digestif généralement vide. L'examen direct des branchies révèle souvent une colonisation importante par des ciliés (*Zoothamnium*). L'hémolymphe de ces individus est massivement colonisée par des bactéries mobiles observables au microscope à contraste de phase et présente des temps de coagulation augmentés. Enfin, la population des bassins affectés montre en règle générale une faible résistance au stress (mortalité importante lors de transfert, pêches partielles, etc...).

Les observations de coupes histologiques effectuées sur des crevettes malades de tous âges pêchées de Janvier 1994 à Janvier 1995 sur la plupart des bassins du Territoire ont permis de décrire le tableau anatomopathologique suivant :

- présence de nodules hémocytaires septiques dans de nombreux organes et en particulier dans la glande digestive, les branchies, la paroi de l'estomac, le coeur, l'organe lymphoïde,
- présence régulière plus ou moins massive de bactéries,
- lésions de vacuolisation de l'organe lymphoïde généralement caractérisées par la présence de corps basophiles (inclusions cellulaires ou images de dégénérescence nucléaire). Ces images peuvent être observées dans d'autres organes (glande digestive en particulier...) chez les individus fortement affectés et sont généralement associées à la présence d'hémocytes picnotiques. Ces lésions ont pu être observées de façon très marquée sur des animaux ayant fait l'objet d'un stress à l'occasion d'une manipulation expérimentale (cf partie 3-1-1 de ce document).

Selon une étude menée au LTDV, l'organe lymphoïde des animaux pêchés (14 animaux dans cette étude) présentaient des lésions de vacuolisation (57%), des nodules hémocytaires ou infiltrations hémocytaires (7%), la présence de bactéries était notée (14%), et inclusions basophiles (50%) et hémocytes picnotiques (78%). Alors que les animaux moribonds capturés (20 animaux) présentaient pour leur part d'importantes lésions de vacuolisation (85%), des nodules hémocytaires ou infiltrations hémocytaires (40%), la présence de bactéries (100%), des inclusions basophiles (100%) et hémocytes picnotiques (100%).

Le coeur et les branchies des animaux moribonds et capturés présentent respectivement 96 et 100% de lésions de type inclusions basophiles, contre 66 et 29% chez les animaux pêchés. Le tableau anatomopathologique présenté par l'intestin et la glande digestive sont sensiblement identiques. Il faut noter, en outre, que dans cette étude 6% des animaux pêchés (soit 1 animal sur 16) présentait des lésions d'entérite hémocytaire contre 0% pour les animaux moribonds capturés (13 animaux également).

3-2 : étude bactériologique

L'hémolymphe des individus malades, échantillonnés dans le cadre de l'étude du syndrome 93, est très généralement colonisée par des bactéries. L'observation de bactéries sur les individus malades a conduit à entreprendre leur identification. Plusieurs centaines de souches ont été isolées à partir d'individus malades ou pêchés au hasard dans différents bassins du Territoire. Ces bactéries sont des *Vibrionaceae* pour l'essentiel, appartenant aux espèces suivantes : *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, et *V. mimicus*. Une étude de ces souches a été réalisée.

Il nous a semblé utile de rappeler quelques généralités bibliographiques sur les communautés bactériennes des environnements marins littoraux et sur les *Vibrio* avant que de présenter notre étude bactériologique du syndrome 93.

3-2-1 : les communautés bactériennes des environnements marins littoraux

Les populations microbiennes associées aux animaux marins dépendent des espèces et du milieu environnant. Il existe en fait une relation entre les potentialités physiologiques de cette flore commensale et les animaux (Tysset, 1961).

Les bactéries marines sont essentiellement des germes à Gram négatif ; cette prédominance a été largement illustrée, Pagnocca *et al.*, 1991, Bianchi *et al.*, 1989, Dempsey *et al.*, 1989, Austin, 1988, Yasuda *et al.*, 1980, ZoBell, 1946, etc... Un petit nombre de genres bactériens est régulièrement isolé en milieu littoral côtier. Cette prédominance est en faveur d'une flore marine mais pas forcément spécifiquement marine. Il est d'ailleurs préférable de parler de bactéries isolées de milieux marins plutôt que de bactéries marines ; cependant, nous persisterons dans cet abus de langage. Bien que certaines bactéries semblent ne pouvoir vivre qu'en milieu océanique (Bertrand et Larsen, 1989), certains groupes, comme les *Pseudomonas* par exemple, comprennent des germes très proches terrestres ou marins (Bergey's manual, 1984, Wood, 1952). Les souches isolées du milieu marin se caractérisent par une exigence ou du moins une tolérance vis-à-vis du NaCl de l'eau de mer. En plus d'une exigence spécifique en Na⁺, certaines souches ont des besoins en ions K⁺, Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺ supérieurs aux besoins exprimés par les bactéries terrestres ou d'eau douce (Bertrand et Larsen, 1989, ZoBell, 1946). La flore marine apparaît donc originale, la représentation des différents genres bactériens dépendant de leur spécificité et de leur aptitude à participer à certaines biocénoses (ces différences au demeurant sont de degré que de nature (Wood, 1952)). Cette notion de biocénose est particulièrement importante si l'on considère les relations qui existent entre microorganismes. Ceux-ci constituent des agrégats ou micelles, en général adsorbés à des particules solides (Kirchman *et al.*, 1987). Austin *et al.* (1979) montrent que les représentants des populations bactériennes attachées à des supports solides (fragments de bois prélevé dans un port) sont retrouvés tout au long de la colonne d'eau ainsi que dans les sédiments qui correspondent au prélèvement. Ils mettent en évidence la succession d'espèces bactériennes dans le temps au cours de la colonisation d'un support ; les interactions bactériennes sont importantes pour l'attachement aux surfaces et leur colonisation. Kolenbrander (1991) a montré la complexité des phénomènes d'adhésion et de colonisation des bactéries de la sphère orale. Le film bactérien se constitue en respect des relations entre bactéries : c'est un lieu d'échanges intenses.

Pfister et Burkholder (1965) ont étudié des souches bactériennes isolées de l'Océan Antarctique et des eaux tropicales de Porto Rico. Les différences entre ces souches ne se limitent pas au caractère psychrophile ; l'utilisation des carbohydrates de façon aérobie ou anaérobie, la synthèse d'indole séparent les deux populations. Si certaines bactéries semblent ubiquistes, *Vibrio parahaemolyticus* par exemple (Kristensen, 1971), d'autres ont une ère de répartition plus restreinte, *Vibrio salmonicida* (Egidius *et al.*, 1986). Un suivi saisonnier des populations bactériennes sur deux sites en baie de Chesapeake (USA) a été réalisé par Cook et Goldman (1976). Ce suivi montre qu'au cours de la période de refroidissement (de Septembre à Décembre) la population totale diminue ; les proportions d'organismes fermentaires, producteurs d'H₂S et de *Vibrio (parahaemolyticus)* diminuent alors que la population de coliformes se maintient. Au cours de la période de réchauffement (de Mars à Juin), les organismes fermentaires augmentent rapidement en nombre, puis *Vibrio*, lorsque les températures atteignent 21°C. Des variations saisonnières comparables ont été mises en évidence par Enger *et al.* (1991) pour *Vibrio salmonicida*. Une récente étude des communautés bactériennes libres et attachées au cours du temps montre que l'évolution de ces communautés n'est pas identique. L'abondance et l'activité des bactéries libres sont

corrélées avec la température et la concentration en nutriments dissous ; alors que la communauté des bactéries attachées est dépendante, pour son abondance, de la quantité de particules, pour son activité, de la température. Il apparaît un équilibre dynamique entre les deux populations, régi par la disponibilité en nutriments et en particules (Unanue *et al.*, 1992).

Cook et Goldman (1976) ont identifié une partie des souches isolées au cours de leur étude de la baie de Chesapeake ; les genres suivants ont été identifiés : *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. Un groupe est constitué (type *Achromobacter*) par des bacilles Gram négatif, non mobiles, oxydase négatifs et fermentatifs. A ces genres, il est possible de rajouter (Austin, 1982) *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Favobacterium*, *Bacillus*, ainsi que certains bacilles à Gram variable ; la liste n'est pas exhaustive.

L'effet de focale sur le genre *Vibrio* dans la littérature doit certainement être versé à son caractère pathogène pour bon nombre d'espèces d'intérêt aquacole, Enger *et al.*, 1991, Gunther *et al.*, 1980, Golten *et al.*, 1975, Kristensen *et al.*, 1971, etc... La présence de bactéries de type *Vibrionaceae* est parfois considérée comme un indicateur de pollution (Pagnocca *et al.*, 1991). Ces auteurs notent que la quantité de coliformes est réduite dans les animaux (*Penaeus schmitti*) alors qu'elle est importante dans l'eau et les sédiments.

De nombreux auteurs s'intéressent aujourd'hui aux capacités de résistance des bactéries en milieu marin. Effendi et Austin, 1991, Rhodes *et al.*, 1988, Xu *et al.*, 1982, Dawes *et al.*, 1978, montrent que *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas salmonicida* et *Escherichia coli* sont susceptibles de survivre dans un état particulier, ces germes sont alors viables mais non cultivables. La validité des tests de salubrité de l'eau pourrait donc être remise en question. Cette remarque va dans le sens des travaux de Pancorbo *et al.* (1992) qui propose de nouveaux indicateurs. Roznack *et al.* (1987) mettent en lumière les stratégies de survie de certains germes en milieu marin. Ces germes viables mais non cultivables posent le problème de la méthode de détection par mise en culture sur milieux artificiels. Mc Kay (1992) étend cette aptitude à *Legionella pneumophila*, *Campylobacter spp* et *Shigella spp.*

La dynamique des populations de bactéries et de phytoplancton au cours d'une production en grand volume montre la succession de trois phases principales (Lelong *et al.*, 1980). La première phase correspond à des conditions oligotrophiques caractérisées par une population phytoplanctonique diversifiée et une population bactérienne elle-aussi diversifiée malgré la prédominance de *Pseudomonas*. La deuxième phase - d'enrichissement - correspond à un peuplement paucispécifique à forte biomasse, *Skeletonema* et *Chaetoceros* deviennent les espèces phytoplanctoniques prédominantes, alors que la diversification des espèces et genres bactériens reste vraie avec dominance relative (50-60%) des *Pseudomonas* du fait de leur aptitude à l'utilisation de micromolécules. La troisième phase est celle du développement zooplanctonique de grandes espèces - rotifères, copépodes - et d'une exubérance des *Vibrio* (de l'ordre de 75%) dont l'équipement enzymatique permet l'utilisation des macromolécules ; suivie d'un retour à un état diversifié proche des conditions initiales, avec composition différente et biomasse supérieure. La dynamique des populations est donc conditionnée par les conditions trophiques du milieu.

La croissance d'algues phytoplanctoniques peut être influencée par la présence de certains genres bactériens. Une souche de *Vibrio anguillarum* a un effet promoteur pour *Chlorella* et *Tetraselmis* (Ukeles et Bishop, 1975). Alors que *Pseudomonas aeruginosa* a un effet inhibiteur pour *Tetraselmis* (Berland *et al.*, 1972). De façon analogue, des extraits de cultures de *Chlorella* ont un effet promoteur pour le développement de *Vibrio alginolyticus* (Morishita *et al.*, 1978). *Skeletonema* stimule la croissance de *Flavobacterium* et inhibe *Vibrio* et *Pseudomonas* (Kogure *et al.*, 1979). *Tetraselmis* ou *Isochrysis* n'ont pas d'effet sur *Vibrio* (Austin *et al.*, 1992, Murchelano *et al.*, 1969).

Le rôle des bactéries dans les processus de minéralisation des matières organiques est primordial. Les microorganismes permettent ainsi la remise en circulation du carbone et de l'azote des macromolécules organiques. En plus de ces fonctions fondamentales, les bactéries interviennent directement dans la nutrition de certains organismes ; ce rôle direct et parfois sous-estimé des bactéries dans la nutrition et le développement du zooplancton rend plus complexe encore les relations entre les différents groupes constitutifs des écosystèmes aquatiques (Rieper, 1978). Une part importante du flux de carbone aux crustacés zooplanctoniques est en effet d'origine bactérienne directe (Wylie *et al.*, 1991).

La flore bactérienne des animaux marins, on le comprend, est représentative de celle de leur environnement, même si les relations qui les relient ne sont pas clairement établies. Colwell et Liston (1962) isolent de

représentant des *Porifera*, *Coelenterata*, *Mollusca*, *Arthropoda*, *Crustacea* et Plathelminthes près de deux cent souches bactériennes appartenant aux genres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* (ainsi que quelques entérobactéries, corynéformes et cocci Gram+). Il y a peu de différences entre les flores hébergées par les différents animaux de ces groupes malgré leur diversité. Cependant, Colwell *et al.* (1975) montrent que sur un même site, la flore du crabe bleu (*Callinectes sapidus*) est différente de celle d'une huitre (*Crassostrea virginica*). Des flores comparables sont retrouvées par Muroga *et al.* (1987), Gilmour *et al.* (1976) chez des vertébrés marins alors qu'elles sont sensiblement différentes chez des invertébrés terrestres, Rivault *et al.* (1991), Eutick *et al.* (1978).

D'un point de vue qualitatif, l'étude de Pagnocca *et al.* (1991) menée en baie de Rio de Janeiro sur *Penaeus schmitti* montre que les groupes bactériens prévalents sont les genres *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* et *Acinetobacter*. Si la plupart des germes isolés du tube digestif appartient au genre *Pseudomonas*, les auteurs ne considèrent pas celui-ci comme spécifique de cette niche. Le comportement fouisseur de cette espèce de pénéide adopté dès les premiers stades post larvaires ainsi que la prédominance des *Pseudomonas* dans les sédiments expliqueraient ce résultat. Pour Dempsey *et al.* (1989) les genres prédominants chez *P. aztecus* et *P. setiferus* sont *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas*. Ces auteurs notent qu'il n'y a pas de relation simple entre la flore et la taille, l'espèce, l'habitat ou le régime alimentaire des animaux. Cependant, la mue du revêtement intestinal pourrait intervenir dans les variations de la flore du tractus digestif. Sugita *et al.* (1987) isolent chez une crevette d'eau saumâtre (*Palaemon paucidens*) - outre les genres déjà cités - de nombreuses entérobactéries, *Bacillus*, corynéformes et cocci. En élevage d'eau de mer, les entérobactéries restent prédominantes dans le tube digestif alors que le milieu extérieur est riche en *Pseudomonas* ; cependant que les flores internes et externes sont voisines lorsque les animaux vivent en eau douce ou peu salée. Un changement de flore bactérienne au cours du temps est mis en évidence par Yasuda *et al.* (1980), avec prédominance de *Pseudomonas* à partir des stades post larvaires ; ces auteurs constatent la prédominance de ce genre bactérien sur les animaux sauvages. Des résultats analogues sont obtenus par Lee *et al.* (1976) alors que Vanderzant *et al.* (1971) estiment que les *Pseudomonas* ne sont pas en quantités significatives ni dans l'eau, ni dans les crevettes (*P. aztecus*). La difficulté qu'il y a d'aborder ces questions est encore illustrée par les travaux de Nieto *et al.* (1984), dont les résultats varient selon le compartiment animal considéré, branchie, tube digestif etc...

Avant que de refermer ce chapitre, il nous faut rappeler l'effet bénéfique des bactéries pour les organismes aquatiques, Beveridge *et al.*, 1991, Bitterlich *et al.*, 1986, Castille *et al.*, 1979. Dempsey *et al.* (1987) montrent la présence de *Vibrio* dans le tractus digestif de pénéides ; ils attribuent le bénéfice de celles-ci aux aptitudes de cette flore à dégrader l'amidon, la gélatine, les acides gras et dans une moindre mesure la cellulose et la chitine. Ces résultats ne sont pas sans évoquer ceux de Eutick *et al.*, 1978, Schultz *et al.* (1978) chez les invertébrés terrestres. Dempsey considère le système pénéide-bactérie comme une véritable symbiose à l'instar de ce qui se passe chez un ruminant, Hungate (1975), McBee (1971). Gatesoupe (1991) attribue un effet bénéfique aux *Pseudomonas* qui constituent une source de nourriture pour les filtreurs proies. Les travaux de Seki (1968) et Hansen (1992) montrent que les entérocytes sont capables de prélever directement des corps ou fractions de corps bactériens (notons ici que ce mécanisme pourrait intervenir dans la stimulation des mécanismes de défense par présentation d'antigène). Par leur métabolisme, production de vitamines par exemple (Sugita *et al.*, 1991), les bactéries associées aux animaux peuvent avoir un effet bénéfique.

Il ressort de ces différentes études que la flore commensale des pénéides est dominée par des germes des genres *Vibrio* et *Pseudomonas*. Ces germes ne sont que partiellement représentatifs de la flore de l'eau ou des sédiments. Les relations entre ces divers compartiments ne sont pas clairement établies. Les genres *Vibrio* et *Pseudomonas* sont potentiellement pathogènes pour les pénéides, Owens *et al.* 1989, Nieto *et al.* 1984.

3-2-2 : les *Vibrio*

jusqu'à une époque très récente, le genre *Vibrio* était évocateur de choléra compte tenu du redoutable pouvoir pathogène de *Vibrio cholerae*, agent de cette maladie (il s'agit en fait de *Vibrio cholerae* sérovar 0:1 - sérotypes Inaba, Ogawa et Hikojima - toxinogénique, tox.:+). Depuis 1817, sept pandémies lui ont été en effet attribuées. Certains épisodes comme celui de "broad street pump" à Londres, en 1849 au cours de la troisième pandémie, sont restés tristement célèbres dans la description de la transmission de la maladie. C'est en 1857 que Pacini découvre chez un patient atteint de choléra une bactérie très mobile et incurvée ; ce n'est que trente ans plus tard que Koch la cultive et la baptise *Vibrio comma* qui deviendra ensuite *V. cholerae*. Malgré ces premiers travaux,

ce n'est qu'au cours des dix dernières années que ce genre révélera un grand nombre d'espèces, pathogènes notamment pour l'homme. La huitième édition du Bergey's manual (1974) ne recensait que deux espèces de vibrions pathogènes pour l'homme, *Vibrio cholerae* et *parahaemolyticus* biotypes 1 et 2 (*V. alginolyticus*) ; on en dénombre aujourd'hui 11 espèces, isolées de cas cliniques, parmi une trentaine d'espèces décrites au total, Janda *et al.*, 1984. Cet "essor récent" du genre ne doit cependant pas nous faire oublier que la vibriose des poissons est une maladie dont la description remonte à 1718, par Bonaveri ; l'isolement et la description de *V. anguillarum* ne seront effectifs qu'en 1893 par Canestrini sous le nom de *Bacillus anguillarum*, (Drouin de Bouville, 1907, Roberts, 1978).

la classification du genre *Vibrio* a connu une histoire faite d'exclusions et de regroupements, de confusions et de controverses. L'histoire moderne ne commence qu'aux années 60, avec la création par Véron en 1961 de la famille des *Vibrionaceae* et individualisation de quatre genres : *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* et *Plesiomonas*, (Véron, 1966). En 1971, Paul et Linda Baumann se trouvent confrontés au problème de classer 145 souches de bacilles, Gram négatif, marins, anaérobies facultatifs, fermentatifs, chimioorganotrophes. Ces souches proviennent des eaux au large de Hawaii. L'étude de la composition en bases de leur ADN regroupe ces germes avec *V. cholerae* ; cependant ce dernier est un habitant du tube digestif ou de l'eau douce, et occupe donc une niche écologique différente. Cette étude met en évidence l'étendue du genre et l'apport majeur de la taxonomie numérique, basée sur le principe adamsonien (Baumann *et al.*, 1972).

La description du genre *Vibrio* repose initialement sur des caractéristiques biochimiques et morphologiques ; la plupart des espèces ainsi décrites ont été confortées, depuis, dans leur appartenance au genre. Ce sont cependant des techniques plus récentes (hybridations quantitatives ADN-ADN, structures enzymatiques, profils d'acides gras etc...) qui ont permis de distinguer les différentes espèces. L'image la plus précise de ce groupe peut être considérée comme le résultat du séquençage de l'ARN 16S (Aznar *et al.*, 1994, Ruimy *et al.*, 1994, Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993), précédé, quelques années auparavant par le séquençage du 5S (MacDonell et Colwell, 1985). Il existe aujourd'hui près de 35 espèces valides ; et l'on peut estimer que bien des groupes de bactéries isolées de l'environnement et décrits récemment donneront naissance à de nouvelles espèces (Janda *et al.*, 1984).

les vibrions sont des bactéries aquatiques retrouvées dans une grande variété d'eaux, notamment les océans, les estuaires, les lacs et les étangs. Les particules en suspension (exosquelette de chitine, cellulose, carbonate de calcium ou zooplancton) constituent le support de ces bactéries ; elles survivent cependant sous forme libre, de façon planctonique. Ces formes libres, parfois appelées microvibrions, semblent correspondre à un mécanisme d'adaptation à des conditions oligotrophiques. C'est un énorme travail que l'étude de leur incidence naturelle et leur capacité de survie en milieu aquatique ; l'image qui se dégage de ces études est marquée par le fait de variations saisonnières et de relations étroites de ces bactéries avec le zooplancton. Leur rôle bénéfique a été montré dans les capacités de rétention du sel par les copépodes, organismes qui occupent une place importante dans la chaîne alimentaire. Les *Vibrio* constituent parfois une part importante de la flore bactérienne de l'eau. Il n'en reste pas moins vrai, nous l'avons vu, que la flore aquatique est constituée de nombreuses espèces bactériennes représentant les genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* etc... Signalons enfin que les vibrions constituent une fraction non négligeable de la flore digestive des animaux marins ; les relations de ces "gut" *Vibrio* avec les taxons clairement identifiés sont encore baignées d'ombre...La symbiose avec les animaux marins, notamment certains poissons téléostéens et céphalopodes, a été réalisée en ce qui concerne *V. fisheri*, trouvé dans les organes lumineux de ces animaux.

Les deux principaux facteurs affectant la concentration des *Vibrio* dans l'eau sont la température et la salinité. Les optimum pour ces bactéries se trouvent dans une gamme de température de 17 à 35°C pour une salinité comprise entre 0,5 et 2,5 ‰. Cependant, les différentes espèces de *Vibrio* expriment différents besoins : les espèces halophiles ont un réel besoin en Na^+ pour leur croissance et supportent des salinités de l'ordre de 12‰ en conditions de laboratoire (*V. alginolyticus*). En plus d'une exigence spécifique en Na^+ , certaines bactéries marines peuvent exprimer des besoins en ions K^+ , Mg^{++} , et Ca^{++} supérieurs aux normes classiques. Il faut distinguer l'halophilie de l'halotolérance. *Vibrio cholerae* lui-même ne nécessite pas de NaCl pour sa croissance mais supporte très bien des concentrations en NaCl de 2‰ et des températures de 20 à 35°C dans son habitat naturel. Les paramètres physico-chimiques de l'environnement peuvent moduler la production de toxine pour cette espèce. Dans l'eau, la concentration en *Vibrio* peut varier rapidement sous l'effet de fortes pluies ou d'apport massif d'eau douce. Si certaines espèces semblent ubiquistes, tel *V. parahaemolyticus*, d'autres au contraire ont une ère de répartition plus limitée ; *Vibrio salmonicida*, par exemple, est confiné aux eaux froides.

L'étude menée sur un grand nombre de souches isolées de l'Océan Antarctique et des eaux tropicales de Porto Rico montre cependant que la psychrophilie ne constitue pas le seul caractère distinguant les deux populations.

Les programmes de surveillance du littoral ont montré, notamment aux Etats-Unis, que de larges portions de côtes sont devenues des zones endémiques de *Vibrio spp.*, pathogènes pour l'homme. De plus, de nombreux cas de gastro-entérites ou surinfections de plaies sont signalés dans des zones éloignées de l'océan, le plus souvent dus à *V. cholerae* ou *vulnificus*. Le rôle des produits de la mer dans ces infections est prépondérant : du fait de la concentration des bactéries par des organismes filtreurs, ainsi que d'habitudes alimentaires de consommation de ces produits crus ou peu cuits. L'étude des eaux, des sédiments et des pénéides de la baie de Sepetiba (Brésil) révèle la présence simultanée de plusieurs espèces de vibrions. Ce résultat est classique ; compte tenu de leurs exigences respectives en NaCl, il n'est pas rare de voir coexister dans des eaux d'estuaires *V. fluvialis* et *V. anguillarum* avec *V. cholerae* et *V. metschnikovii*.

Le contact avec une eau contaminée peut constituer un risque majeur de surinfection de plaies ; contact par immersion, micro lésions, blessures, morsures par animaux marins, etc...Au sein d'une même espèce, il existe une très grande variabilité de l'expression de la virulence entre différentes souches isolées de l'environnement. Des bactériémies à *V. vulnificus* peuvent conduire à la mort selon le statut immun du patient. Il existe cependant fort peu de données concernant les doses infectantes en fonction de l'état du système immunitaire du malade.

L'isolement de *Vibrio* de l'environnement demande de ne rien négliger des différents compartiments qui le constituent (à savoir essentiellement de l'eau, des sédiments, des eaux usées et des animaux). Le traitement rapide des prélèvements est nécessaire. Le maintien de l'échantillon à basse température limite les variations de la flore microbienne ; *a contrario*, le stress du froid combiné à d'autres stress peut modifier la réponse des *Vibrio* à la mise en culture. Dans la mesure où ces bactéries sont parfois en faible quantité dans l'eau, il peut être nécessaire de les concentrer (à l'aide d'un système de filtres par exemple). L'isolement de *Vibrio vulnificus* à partir de broyats d'huître peut être entravé par le relargage de facteurs léthaux lors du broyage. Alors que ces germes sont parfois très concentrés, une étape d'enrichissement peut s'avérer nécessaire. Celle-ci est basée sur leur aptitude à pousser rapidement en milieu alcalin, leur résistance aux sels biliaires et leur tolérance vis-à-vis de concentrations élevées en NaCl. Différentes recettes de milieux ont été établies qui permettent cette étape ; le milieu TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose) permet l'isolement sélectif des *Vibrio*. Ces milieux, lorsque l'organisme recherché a été ciblé, peuvent constituer un gain précieux de temps et d'argent pour le laboratoire.

La protection des populations vis-à-vis du risque d'infection à *Vibrio* comprend, on le voit, le contrôle à la fois des denrées alimentaires et des contacts avec des eaux contaminées ; cet objectif est illusoire en pratique. La surveillance du littoral ne comprend en général qu'une évaluation de la flore hétérotrophe totale ou d'indicateurs de pollution. De récentes études ont mis en évidence la possibilité d'un état viable mais non cultivables chez *E. coli* et *V. cholerae*. Depuis, cet état particulier de survie a été mis en évidence pour de nombreuses espèces de *Vibrio* mais aussi d'entérobactéries. En ce qui concerne le choléra, on a pensé longtemps à un réservoir humain mais ces derniers travaux écologiques mettent en lumière la possibilité d'un réservoir dans l'environnement aquatique approprié (en termes de salinité et de température notamment). Les germes viables mais non cultivables posent le problème de la validité de leur détection par les méthodes classiques de mise en culture ; de nouveaux indicateurs devraient être proposés qui tiennent compte des limites révélées ici.

En 1984, l'International Commission on Microbiological Specification for Foods recommandait de ne pas dépasser les 100 Colonies Formant Unités de *V. parahaemolyticus* par gramme dans les crevettes crues. Les fruits de mer conservés vivants voient parfois leur maximum de concentration en *Vibrio* atteint jusqu'à sept jours de conservation. Ces concentrations sont nettement inférieures dans les produits transformés ; le traitement par la chaleur permet en général de s'affranchir de ces germes.

Les vibrions peuvent être considérés comme un groupe parmi les plus redoutables en aquaculture. Les références d'infections à *Vibrio* en aquaculture sont extrêmement nombreuses. Une étude récente a montré que *Vibrio harveyi* était pathogène pour *Penaeus monodon* en Thaïlande. Les animaux montrent une invasion des tubules de l'hépatopancreas parfois suivie d'une dissémination du germe dans l'hémolymphe. Des lésions de nécrose sont observables en histologie. Certains animaux particulièrement infectés le sont avec plusieurs types de *Vibrio spp.*. Cependant, d'autres travaux ont montré que des crevettes (*P. monodon* ou *S. ingentis*) étaient capables d'éliminer en quelques heures des bactéries (notamment *V. alginolyticus*) qui leur étaient injectées. L'étude des relations entre des *Vibrio* pathogènes (*tubishii* et *anguillarum*) et des *Vibrio* de l'environnement montre que ces différentes souches ne sont pas aisément distinguables par des tests classiques ; ils diffèrent cependant de façon

significative quant à leurs aptitudes métaboliques et écologiques, ainsi bien sûr que sur leur pouvoir pathogène. Les infections à *Vibrio* sont parfois considérées comme une rupture d'équilibre avec un germe commensal ou dues à un pathogène spécifique. L'émergence depuis les années soixantes d'un nouveau type de *V. cholerae* (El Tor), longtemps considéré comme commensal n'a pas encore reçu d'explication satisfaisante. Elle met cependant en évidence l'acquisition possible de virulence par un germe réputé saprophyte.

La virulence des bactéries de type *Vibrio* ou *Escherichia* a été particulièrement bien étudiée chez les mammifères. L'hôte (bien malgré lui) de ces bactéries constitue un milieu défavorable et hostile à leur développement. Dans le cas des *Enterobacteriaceae*, la capacité de croissance en présence de très faibles concentrations en fer est d'un grand intérêt ; la majeure partie du fer contenu dans les tissus est en effet sous forme liée, fixée par des ferritine, haemosidérine, myoglobine ou hémoglobine. La possession d'un système de séquestration du fer constitue donc un atout majeur pour un agent pathogène. La plupart des souches virulentes de *V. anguillarum* possèdent un plasmide permettant de séquestrer le fer à partir de transferrine. La perte de ce plasmide entraîne une réduction du pouvoir pathogène de ces souches. Les plasmides semblent constituer un support majeur de facteurs de virulence dans le genre *Vibrio*.

La faculté d'adhérer à un substrat sur lequel elle assure sa croissance constitue pour une bactérie un autre aspect majeur de la virulence. C'est pourquoi les facultés d'attachement des vibrions, notamment *V. cholerae*, ont été très étudiées. Les mécanismes d'adhésion sont multiples impliquant parfois des processus de spécificité variée. Les couches additionnelles, les pili ou fimbriae peuvent intervenir dans le processus d'attachement. La toxine de *V. cholerae* comprend deux sous-unités ; la sous-unité "A", responsable de l'activité toxique, ne peut seule entrer en contact avec une cellule saine. Le rôle des toxines dans le processus pathogénique est établi ; celles-ci font partie de l'arsenal classique des germes pathogènes. Cependant un grand nombre de souches non pathogènes synthétisent dans le cadre de leurs activités saprophytiques des enzymes extracellulaires à activité hémolytique. La distinction de ces enzymes des hémolysines est difficile.

La virulence relève donc d'un équipement plus ou moins complet permettant l'agression de l'hôte. Le chimiotactisme, la mobilité, la capacité d'adhésivité, ou la production de toxines sont autant d'outils au service de la bactérie pathogène. Un inoculum de bactéries entéropathogènes provenant directement d'un malade est adapté à la croissance dans l'intestin et peut donner immédiatement une croissance logarithmique. Les foyers épidémiques peuvent donc constituer un inoculum plus "virulent".

les *Vibrio* constituent l'un des groupes majeurs de la flore aquatique, on les trouve donc dans l'eau, les sédiments et les animaux. Ce sont des germes de l'environnement aux variations duquel ils sont capables de s'adapter. Si certaines espèces sont réputées pathogènes, la virulence au sein d'une même espèce peut être extrêmement variable d'une souche à l'autre. Leur isolement et leur identification font aujourd'hui appel à des techniques parfois sophistiquées.

3-2-3 : étude bactériologique du syndrome 93

L'étude bactériologique du syndrome 93 consistait dans sa première phase, en une identification et un essai de typage de quelques souches de *Vibrionaceae* isolées en Nouvelle-Calédonie.

Les souches bactériennes correspondent à des prélèvements d'hémolymphes, de glandes digestives, à partir d'animaux en grossissement, de prélèvements d'eau ou de sédiments. Ces prélèvements sont réalisés sur différents sites, lors d'épisodes de mortalité ou en dehors de tout contexte pathologique. Les prélèvements sont mis en culture sur milieux gélosés : Marine Agar (2216 E de ZoBell), TCBS (et Hektoen en ce qui concerne les prélèvements d'eau). Chaque colonie macroscopiquement différente est isolée et mise en culture pure sur milieu TSA à 2% de NaCl. La collection de souches est conservée dans un milieu à 10% de glycérol à -80°C. Chaque souche est caractérisée au niveau du genre selon les tests suivants : coloration de Gram, morphologie, mobilité, oxydase, voie d'attaque du glucose sur milieu MEVAG, type respiratoire sur gélose VF, croissance et coloration sur TCBS, luminescence sur Marine Agar. Puis, dans une deuxième étape, les germes de la famille des *Vibrionaceae* sont étudiés sur la base d'un grand nombre de caractères phénotypiques : auxanogrammes sur 99 sources de carbone. Les résultats de ces tests sont mis en place sous forme de matrice et traités en taxonomie numérique, classification hiérarchique ascendante (logiciel clash, et taxolab®). Les résultats des auxanogrammes sont traités par un logiciel d'identification (logiciel reconniser®).

Plusieurs centaines de souches ont été isolées à partir d'individus malades ou pêchés au hasard dans différents bassins du Territoire. Ces bactéries sont des *Vibrionaceae* pour l'essentiel. La caractérisation phénotypique d'une cinquantaine de souches a conduit à l'identification présomptive de *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, et *Aeromonas hydrophila*.

Quelques modofformes des taxons individualisés par ces méthodes ont fait l'objet d'une identification génomique sur la base de leur profil de restriction des gènes codant pour les rRNA (il est prévu que ces résultats soient vérifiés par hybridation quantitative ADN-ADN avec des souches de référence à l'IPP, S. Koblavi, communication personnelle). Un grand nombre de souches ayant disparu au cours des études préliminaires, des repiquages successifs et de la conservation, cette étude portait en fait sur 23 souches conservées vivantes et pures en collection et représentant donc les principaux profils de *Vibrio* isolés dans le cadre du syndrome 93.

Deux techniques ont été utilisées : une caractérisation phénotypique (biotypage) et génomique (ribotypage). Les biotypes sont réalisés selon le principe de l'auxanogramme, croissance en milieu minimum à partir d'une unique source de carbone, en galerie commercialisée (Biotype 100, Biomérieux. La réalisation des ribotypes suit la séquence suivante : restriction de l'ADN bactérien, électrophorèse des fragments générés, transfert sur membrane puis hybridation à l'aide d'une sonde 16 et 23 S de *E. coli*, (Grimont et Grimont, 1988). Les résultats obtenus par ces méthodes permettent d'une part d'identifier des souches après confrontation à une base de données, et d'autre part de constituer des groupes d'individus similaires.

Les résultats des biotypes ont permis d'identifier les groupes *Vibrio harveyi* et *V. alginolyticus*, ainsi qu'un ensemble de souches présentant des atypies pour *Vibrio mimicus*. Enfin des souches non identifiées, bacilles, Gram négatifs, possédant une oxydase, mobiles, aero-anaérobies facultatifs (vérifié pour AQ51) et fermentant le glucose qu'il est donc possible de ranger dans le groupe des *Vibrionaceae*.

Les souches qui n'ont pu conduire à un résultat d'identification satisfaisant montrent un nombre limité de résultats de tests positifs en 4 jours. Il peut s'agir de conditions culturelles défavorables à la croissance de ces souches (milieu de dilution, sources de carbone proposées, NaCl et MgCl₂ ajoutés...), ou bien de souches appartenant à des genres différents de *Vibrio*.

Le typage moléculaire des souches incluses dans cette étude a permis de confirmer l'identification des souches isolée à *V. harveyi*, *V. alginolyticus* et *V. mimicus*.

Le schéma donné en illustration appelle cependant quelques commentaires. La souche AQ16 donne un ribotype qui correspond à *Vibrio alginolyticus*. En auxanogramme, elle n'est pas identifiée car sa croissance a été faible (vigor 23, normalement de l'ordre de 30 pour les souches d'*alginolyticus*). La souche W9 n'a pas donné les mêmes résultats pour les galeries faites à Nouméa et à Paris. Il semble que la croissance ait été plus forte en milieu medium 1 (16 sources) qu'en medium 2 (31 sources). Le ribotype fait parti de ceux non encore identifiés dans la banque de l'UE IPP. Les résultats pour les galeries faites à Nouméa et à Paris avec des milieux différents montrent des résultats parfois divergents. En général, ces divergences portent sur des caractères lents (4 jours) et pourraient être liés à la charge de l'inoculum.

Les souches AM23 et SV1 sont similaires dans leur utilisation des sources de carbone. Leurs profils de gènes rRNA sont identiques mais ne sont rattachés à aucun profils types disponibles à l'heure actuelle dans la banque. Cette souche AM23 pose de nombreux problèmes d'isolement, de croissance et de conservation. Les exigences culturelles de cette souche pourraient être à l'origine de sa perte fréquente au laboratoire. Quoiqu'il en soit, les résultats d'auxanogrammes ne correspondent pas pour ces deux souches à ceux des groupes d'hybridation définis à l'IPP pour les *Aeromonas*.

Les souches qui présentent en auxanogramme des atypies pour *Vibrio mimicus* ou qui sont non identifiées ont des profils de gènes rRNA non homogènes. Dans la banque de données des ribotypes, ces souches forment deux groupes : SF37 (1A) et AQ51 sont similaires et proches de *V. pelagius* et de souches *Vibrio spp.* isolées d'eaux du Venezuela ; AQ43-2 et S2-1 qui ont des profils proches mais non identiques forment un cluster à part. Pour ces deux groupes, il n'y a pas de corrélation entre les résultats de ribotypie et de biotypie. La souche AQ38-1 présente un profil très proche de celui de la souche type de *Vibrio furnisii* ; en auxanogramme, le résultat est proche de *V. fluvialis*, très proche de *furnisii* qui a longtemps été considéré comme le biotype 2 de *fluvialis*.

L'isolement de bactéries du genre *Vibrio* n'a rien pour surprendre dans la mesure où celui-ci constitue une fraction de la flore microbienne classiquement associée aux animaux marins (Pagnocca *et al.*, 1991, Dempsey *et al.*, 1989, etc...). Il est à souligner que des pratiques bactériologiques courantes, notamment l'utilisation en parallèle aux milieux "flore hétérotrophe totale", de milieux sélectifs comme le TCBS, favorisent leur isolement.

L'association du genre *Vibrio* aux produits marins n'en reste pas moins une donnée importante que vient renforcer son implication dans diverses épizooties dans les élevages de crevettes péneïdes (Anderson *et al.*, 1988, Boemare *et al.*, 1978, etc...). L'hémolymphe des crustacés est en général considérée comme stérile quoiqu'il soit possible d'isoler - en petites quantités - des germes des genres *Pseudomonas*, *Aeromonas* ou *Vibrio* à partir d'hémolymphe de crevettes apparemment saines (CRC Handbook of Mariculture, vol.1, 1983, pp. 289-320, McVey, J.P.(ed.)). Des travaux antérieurs portant sur les hémolymphe de crabe, *Callinectes sapidus*, confirment cette donnée (Colwell *et al.*, 1975).

Le diagnostic de bactériose repose en fait sur la mise en évidence de la présence d'un grand nombre de bactéries dans l'hémolymphe ou les tissus d'animaux moribonds. Examens à l'état frais, frottis ou calques de tissus colorés au Gram, histologie ou mise en culture sur divers milieux permettent donc d'établir ce diagnostic. Les commémoratifs des souches isolées en Nouvelle-Calédonie (AQ66 ou W1) montrent que celles-ci sont parfois présentes en quantités telles qu'il est peu probable que cette présence soit fortuite. L'équipe du LTDV a pu depuis plusieurs mois multiplier ce type d'observations (R. Costa, communication personnelle), à partir d'examen d'hémolymphe à l'état frais, de frottis, de coupes histologiques et de mises en cultures sur milieux non sélectifs. C'est donc tout naturellement que dans le cadre d'une mortalité massive - syndrome 93 - l'hypothèse d'une étiologie bactérienne voit le jour. Rappelons ici que les bactérioses constituent une des causes majeures de mortalité en pénéculture, quoique fréquemment associées à de mauvaises conditions d'élevage (Lightner, 1988).

La présence des espèces *alginoliticus*, *harveyi* et *mimicus*, en milieu littoral est connue, nous l'avons ; elles ont d'autre part été associées à certains épisodes pathologiques en pénéculture (Anderson *et al.*, 1994, Jirivanichpaisal *et al.*, 1994, Baticados *et al.*, 1990). Rappelons ici que de nombreuses autres espèces de *Vibrio* se sont révélées potentiellement pathogènes en élevage aquacole. Il apparaît cependant que lors des études de ces épizooties (Mohny *et al.*, 1994), un type de *Vibrio* domine parmi les souches isolées. Cette image de l'épizootie peut toutefois être différente, impliquant plusieurs espèces ou même plusieurs genres bactériens, lorsque les conditions d'élevage, notamment, ou des pathologies intercurrentes prédisposent les animaux à ces infections ; ce sont du moins les conclusions avancées par certains auteurs (Anderson *et al.*, 1988). Celles-ci corroborent le caractère opportuniste généralement reconnu aux germes du genre *Vibrio*.

Nos résultats vont dans ce sens ; si l'on considère en effet les isollements faits à partir de trois crevettes moribondes d'un même bassin et le même jour (SF2, SF5, SF8) : ces trois souches représentent deux espèces différentes de *Vibrio*, de plus les deux souches identifiées à *V. harveyi* montrent des profils de gènes rRNA distincts (SF2 et SF8), ces deux souches sont différentes. Ce type de résultat nous amènerait à conclure que l'envahissement bactérien mis en évidence chez les animaux moribonds est dû à des germes opportunistes intervenant à la faveur d'une situation de déficience des défenses de ces animaux. Cependant, les données des dénombrements de ces trois souches lors de leur isolement nous manquent ; avant que de conclure, il faudrait donc pouvoir s'assurer que les souches SF 2, 5 et 8 correspondent bien toutes les trois à un envahissement massif de l'animal (donnée manquante). Ce type de données est disponible pour les souches AQ66 et W1, identifiées à *V. alginolyticus* et *harveyi* respectivement, et présentes sur gélose aux nombres de 500 et 300 CFU ; cependant, les conditions de leur isolement (animal 7-W2 pêché, congelé) limitent la portée d'un tel résultat.

Ainsi, le choix d'un typage moléculaire se voit tout à fait justifié dans cette étude préliminaire. La phénotypie lorsqu'il s'agit de germes environnementaux, extrêmement versatiles, ne permet pas le typage fiable des souches isolées. Cette méthode conduit à distinguer des individus (AQ50, code 4063 en API 10E et SF5, code 5142) que les auxanogrammes ou les ribotypes démontrent être identiques ; de plus, chaque individu apparaît différent de lui même, lorsque les tests sont répétés (API 10E).

Une expérience ultérieure est donc à envisager, portant sur un nombre important de souches, isolées lors d'un ou de quelques épisodes de mortalité massive et correspondant à un envahissement significatif des animaux ; parallèlement, un typage des germes présents dans l'eau au cours de ces événements apporterait un complément d'information substantiel.

L'étude bactériologique à ce point semble donc évoquer l'intervention de germes opportunistes du genre *Vibrio* ; nous avons souligné les limites de cette étude que l'on doit considérer comme préliminaire. Une expérience complémentaire est indispensable, qu'il est proposé de réaliser (par amplification génique aléatoire, notamment) sur un ensemble rigoureusement sélectionné de souches bactériennes afin de vérifier leur caractère clonal. Enfin, compte tenu des difficultés culturales et du pouvoir pathogène particulier de ces germes, soulignons qu'il serait intéressant de satisfaire l'isolement et la conservation des germes du groupe de la souche AM23, afin de préciser son rôle épidémiogène.

3-3 : statut des animaux élevés vis-à-vis du IHHNV.

Malgré l'absence de signes pathognomoniques ou même évocateurs d'infection par l'IHHNV, il semblait important d'aborder cette éventualité compte tenu, notamment, de l'importance de ce pathogène pour *P. stylirostris* et de sa possible « tolérance » à ce virus.

L'apparition sur le marché d'un kit de diagnostic fiable et rapide du virus IHHN (ShrimpProbe IHHN DiagXotics) permet de réaliser une recherche de ce virus de façon plus aisée et plus sensible que par le diagnostic histologique classique. Le kit permet de réaliser l'examen d'une cinquantaine de lames, et permet donc uniquement d'avoir une idée approximative de la prévalence de l'infection à IHHNV au sein de ces populations. Nous avons réalisé ce dépistage du virus sur les stocks de *P. stylirostris* et de *P. vannamei* du COP à Tahiti ainsi que sur certains individus *P. stylirostris* issus d'un bassin atteint par le Syndrome 93 en Nouvelle-Calédonie.

Ce dépistage a permis de vérifier que le virus IHHN ne semblait pas jouer un rôle dans le déclenchement des pathologies de type Syndrome 93, en particulier des vibrioses qui sont habituellement décrites comme opportunistes, intervenant sur des animaux débilisés (Brock *et al.*, 1992)

3-3-1 : le virus IHHN : répartition, espèces cibles, conséquences :

La répartition du virus IHHN est mondiale, sa présence est notée aussi bien sur les individus sauvages que sur les élevages en captivité.

Les espèces chez qui la présence naturelle du virus a été décrite sont (Lightner, 1988 ; Lightner, 1992) : *Penaeus stylirostris*, *P. vannamei*, *P. monodon*, *P. japonicus* et *P. semisulcatus*. Ces espèces, dont certaines sont présentes dans le milieu naturel en Nouvelle-Calédonie, par exemple *P. semisulcatus* notamment, peuvent occuper une place épidémiologique de réservoir du virus, et jouer un rôle important dans la contamination des espèces élevées. Des infections expérimentales ont été faites sur d'autres espèces, laissant présager la possibilité de l'infection naturelle chez celles-ci (Lightner, 1988 ; Lightner, 1992) : *P. setiferus*, *P. aztecus*, *P. californiensis* et *P. duorarum*.

La transmission du virus est aussi bien verticale qu'horizontale. Les individus qui survivent à une infection restent porteurs du virus à vie et le transmettent à leur descendance. (Lightner, 1988 ; Lightner, 1992). Les conséquences de l'infection naturelle sont variables selon les conditions d'élevage (densité, qualité du milieu, stress...), les espèces, voire les souches au sein d'une même espèce. Les espèces les plus sensibles parmi celles qui intéressent l'aquaculture sont *P. stylirostris* (la plus sensible), *P. vannamei*, *P. monodon*.

Chez *P. stylirostris*, l'infection se traduit le plus souvent par une épizootie provoquant une très importante mortalité. Les symptômes de l'infection à IHHN ne sont pas spécifiques : on note chez les juvéniles infectés une baisse de la consommation de l'aliment, suivie de changements d'apparence et de comportement. Les crevettes atteintes nagent lentement vers la surface, s'y immobilisent, puis coulent en tournant sur elles-mêmes (face ventrale vers le haut). A ce stade, les crevettes présentent souvent des marques blanches ou beiges, principalement à la jonction entre les tergites abdominaux. Cet aspect s'estompe, et les crevettes moribondes ont un aspect bleuté, ainsi qu'une opacification de la musculature abdominale. (Lightner, 1992). Chez les crevettes

plus âgées, l'infection par le virus IHHN peut se traduire par un affaiblissement général favorisant des pathologies opportunistes (vibrioses en particulier), Brock *et al.*, 1992.

Ces symptômes sont très peu spécifiques de l'infection à IHHN et ne permettent qu'une suspicion dans les cas où la prévalence de l'infection à IHNV n'est pas connue.

Chez *P. vannamei*, l'infection provoque un syndrome décrit antérieurement à la découverte du virus comme "RDS" pour "Runt-deformity syndrome", traduisant d'une part l'apparition sur les crevettes de déformations (jusqu'à 30% des individus), d'autre part, du point de vue zootechnique, une forte hétérogénéité des lots atteints, caractérisée par une répartition bimodale de la population. Les déformations observées concernent principalement le rostre, parfois les antennes et la cuticule du céphalothorax. Ce syndrome RDS semble néanmoins pouvoir exister sans la présence de l'IHNV (Lightner, 1988 ; Lightner, 1992).

Chez *P. monodon*, l'infection est souvent inapparente, mais il peut exister des cas de maladie aiguë, avec des phases épizootiques comparables à celles observées chez *P. stylirostris*. (Lightner 1988; Lightner, 1992)

La présence du virus dans les élevages de *P. stylirostris* ou de *P. vannamei*, a été et est encore la cause de fortes mortalités (*P. stylirostris*) ou de déformations abaissant nettement la valeur marchande des crevettes atteintes (*P. vannamei*) et a donc des conséquences économiques importantes. La souche Aquacop SPR 43^d permet d'élever sans épizootie, donc avec une rentabilité accrue, *P. stylirostris* dans les zones où la présence du virus est enzootique.

3-3-2 : méthodes de diagnostic :

Du point de vue anatomo-pathologique, les lésions observées sont des lésions nécrotiques non spécifiques affectant les tissus d'origine ecto- et mésodermique. La lésion pathognomonique de l'infection par le virus est la présence de corps d'inclusion nucléaires éosinophiles (Corps de Cowdry de type A). Le diagnostic histologique est donc possible, mais délicat et peu fiable sur des cas d'infection peu sévère ou sur des populations où la maladie a une faible prévalence.

Le kit (ShrimpProbe IHHN DiagXotics) fonctionne sur le principe de l'hybridation moléculaire ADN/ADN (ADN viral/ADN sonde marquée) et offre ainsi une très grande spécificité et une plus grande facilité d'interprétation. Néanmoins, ce kit ne permet d'examiner qu'une cinquantaine de lames et ne nous permettait donc pas de réaliser cette détection du virus sur un nombre important d'individus. L'interprétation statistique des résultats demande donc une grande prudence.

Quel que soit le mode de diagnostic choisi, il est possible d'en augmenter la sensibilité en provoquant un stress dans les 10 à 45 jours qui précèdent le prélèvement des individus à tester. Ce stress a pour conséquence d'augmenter la sévérité de l'infection, et donc d'en faciliter le diagnostic, mais présente l'inconvénient d'augmenter la prévalence par transmission horizontale du virus (Lightner 1988; Lightner 1992).

^d La souche de *P. stylirostris* élevée au COP est une souche dénommée "*P. stylirostris* Aquacop SPR 43". Cette souche sélectionnée par Aquacop puis testée au COP et à l'ERL de Tucson (Arizona, USA) est résistante au virus IHHN. La résistance de cette souche se traduit au niveau de l'épidémiologie par le fait que les "*P. stylirostris* Aquacop SPR 43" apparaissent comme étant porteurs sains du virus, ceci se traduisant par des résultats zootechniques comparables à ceux obtenus avec des élevages de *P. vannamei* (Weppe *et al.*, 1993). Il serait intéressant de vérifier si ces porteurs sains, qui ne déclenchent pas de "maladie IHHN" ne sont pas non plus débilisés du fait de la présence du virus au sein de leur organisme. La stabilité génétique de cette souche n'est pas connue.

Choix des individus prélevés :

Nous avons prélevé pour la réalisation du test 70 individus répartis de la façon suivante :

<i>P. stylirostris</i> souche COP :	20 individus
<i>P. stylirostris</i> souche NC élevées au COP :	15 individus
<i>P. stylirostris</i> NC issues d'un bassin à "Syndrome 93" :	15 individus
<i>P. vannamei</i> COP à rostre tordu :	5 individus
<i>P. vannamei</i> COP choix aléatoire :	15 individus

Le prélèvement était soit un demi céphalothorax (*P. stylirostris* NC issues d'un bassin à "Syndrome 93") soit limité à un morceau de nerf et un morceau de branchie, afin de pouvoir placer plusieurs individus par lame et ainsi d'augmenter le nombre d'individus testés. Ceci présente néanmoins l'inconvénient de diminuer la sensibilité du test pour ces individus (Bonami, communication personnelle)

3-3-3 : résultats :

Histologie classique :

Il n'a été observé de corps de Cowdry de type A, ni en Nouvelle-Calédonie au cours des différents examens histologiques que nécessitait le "syndrome 93" sur les individus prélevés dans les bassins où ce syndrome est observé (Costa, communication personnelle), ni au COP sur ces mêmes prélèvements ou sur des examens de routine concernant des individus du COP.

Utilisation du kit ShrimpProbe :

Les résultats bruts des examens sont présentés dans le tableau suivant :

Sur les 70 individus testés,

3 sont faiblement à très faiblement positifs,

67 sont négatifs,

aucun individu n'est fortement infecté.

<i>P. stylirostris</i> souche COP :	19 négatifs /20
<i>P. stylirostris</i> souche NC élevées au COP :	14 négatifs /15
<i>P. stylirostris</i> NC "syndrome 93" :	15 négatifs /15
<i>P. vannamei</i> COP à rostre tordu :	5 négatifs /5
<i>P. vannamei</i> COP choix aléatoire :	14 négatifs /15

Soit en résumé :

échantillons	Nombre testé	Non négatifs	Prévalence
Styli COP + NC COP	35	2	5,7 %
Vanna COP	20	1	5 % *
Total COP	55	3	5,5 %
Styli NC	15	0	0 % *

*Prévalences calculées sur peu d'individus et qui n'ont qu'une valeur indicative, du fait de la faible prévalence totale.

Conclusions :

Les prévalences calculées de l'infection à IHHN sont faibles tant au COP que sur le bassin à Syndrome 93 de Nouvelle-Calédonie. Ces prévalences sont peut-être légèrement sous-estimées du fait que le test, s'il est d'une très grande spécificité, n'a pas une grande sensibilité lorsqu'il est utilisé sur une petite quantité de matériel (branchies et nerfs, cf. supra).

La mise en évidence expérimentale de *Vibrio* pathogènes par injection intramusculaire ainsi que les lésions observées en histologie classique permettent de supposer qu'une vibriose intervient dans la pathogénie du Syndrome 93.

Néanmoins, les vibrioses des Pénéides sont décrites comme étant le plus souvent des maladies opportunistes révélant un terrain débilisé provenant de problèmes viraux et/ou zootechniques (Brock *et al.*, 1992). La question était alors posée de savoir si la souche néo-calédonienne de *P. stylirostris* était toujours résistante au virus IHHN. Dans le cas contraire, ce virus pourrait préparer le terrain de la vibriose.

L'absence de porteur du virus sur les 15 individus provenant d'un bassin à Syndrome 93 testés permet :

- de conclure à une prévalence du virus dans ce bassin très faible ou nulle, et par conséquent,
- d'exclure l'intervention de l'IHHN dans le déroulement de la maladie.

3-4 : pathologie expérimentale.

Il est important, on le comprend aisément, de préciser le rôle étiologique des souches bactériennes isolées dans le cadre de cette étude (*Vibrio spp.* notamment) en tant que facteurs déterminant ou aggravant du syndrome 93. Le pouvoir pathogène de ces bactéries par injection intra musculaire à des crevettes saines s'avère parfois redoutable. Citons la DL50 de l'ordre de 35 CFU pour la souche AM23 (ou 1042).

D'autre part, compte tenu de la suspicion d'une origine virale sur la base des observations faites en histologie, des essais de reproduction expérimentale de la maladie ont été entrepris par balnéation ou injection d'un ultrafiltrat de crevettes mourantes prélevées au cours d'épisodes aigus et stockées à -70°C. Ces expériences mettent en évidence le pouvoir pathogène d'entités ultrafiltrables présentes chez les individus moribonds.

Enfin, rappelons que du fait de l'impossibilité de stimuler des mécanismes immunitaires spécifiques inexistantes, l'approche la plus prometteuse dans la lutte contre les maladies semble être l'obtention d'animaux « tolérants » à certaines pathologies. La reproduction expérimentale d'une maladie au laboratoire ouvre, en fait, la voie à la sélection par le biais de la génétique quantitative. D'autre part, des travaux concernant les mécanismes de défense mis en jeu par les animaux vis à vis d'infections peuvent aboutir à la définition de traceurs de résistance utilisables dans une stratégie de sélection.

Deux agents pathogènes (apparemment de natures différentes, souches de *Vibrio* AM23 et Z1 et entités ultrafiltrables) nous permettent donc aujourd'hui d'appliquer les postulats de Koch concernant la démonstration d'une pathogénie.

^d La prévalence calculée de l'infection à IHHN au COP (5,5%) peut être considérée comme assez fiable vu le nombre d'individus testés. Elle permet de conclure au caractère enzootique du virus IHHN sur le COP. Néanmoins, cette prévalence, faible, peut jouer un rôle favorable dans la conservation de la souche résistante de *P. stylirostris* "Aquacop SPR 43" en maintenant une pression de sélection sur les élevages. Chez les *P. vannamei* du COP, la prévalence calculée est faible. Il est difficile de savoir si l'IHHN intervient dans les malformations observées chez de nombreux individus. En effet, aucun individu sur les 5 choisis en raison de fortes déformations ne s'est révélé positif. Il serait intéressant de renouveler le test sur des individus auxquels on aurait fait subir un stress afin d'augmenter la sensibilité du dépistage.

3-4-1 : pathologie expérimentale à partir de souches bactériennes

Le but de ces expériences est d'évaluer la pathogénicité de suspensions bactériennes testées sur *Penaeus stylirostris*, et obtenir une échelle de comparaison entre les souches toutes récupérées préalablement sur des animaux moribonds dans les fermes de Nouvelle-Calédonie.

Manipulation du 30/09/94

Matériel et méthodes

- **Bacs** : en fibre, de 250 l d'eau de mer, sans renouvellement d'eau, aération assurée par bulleur branché sur les conduites d'air sous pression. Désinfection du bac et de l'eau d'élevage par chloration, pendant deux jours.

- **Crevettes** : *Penaeus stylirostris* de 10 g de poids moyen, (écart type : 1,6 g), pêchées le 27/09/94, stockées dans deux bacs de 500 litres en circuit ouvert. Répartition des crevettes en lots expérimentaux dans les 250 litres la veille du challenge infectieux.

- **Souches bactériennes** : *Vibrio sp.*

4042 (Z1): Isolée de Seafarm en Janvier.

AQ 63: Isolée d'Aquamer.

- **Inoculum** : 40 μ l de suspension bactérienne. Bouillon initial de cinq heures de culture en ZoBell liquide. Pour chaque souche, deux dilutions en eau de mer stérile sont testées, la plus concentrée correspondant à une dose de 10⁵ bactéries par gramme de crevette, la deuxième correspondant au dixième de cette dose.

- **Estimation du nombre de bactéries injectées** : les comptages lors de l'infection sont effectués par lecture au microscope direct à contraste de phase du bouillon initial à l'aide d'une cellule de Mallassez, après dilution de moitié dans une solution de formol. On dilue alors ce bouillon de façon à obtenir une dose proche de celle choisie pour le challenge. Des boîtes de Pétri (en gélose ZoBell) sontensemencées avec des dilutions successives de 10 en 10 des suspensions bactériennes injectées.

- **Vérification de la quantité de bactéries injectées** : comptage des unités formant colonies (CFU) sur des cultures de 24 heures en gélose ZoBell. Vérification de l'homogénéité entre les boîtes de comptage et avec les estimations Mallassez.

- **Injection intramusculaire** de 40 μ l de l'inoculum bactérien ainsi réalisé à l'aide d'une seringue à insuline (aiguille 0.5 x 16 mm, dont la longueur est limitée par un morceau de tuyau cristal). Deux lots séparés de dix crevettes chacun seront injectés pour chaque challenge testé.

Résultats :

Comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez :

Pour la souche 4042, on compte 3000 bactéries/mm³ ; avec dilution 50% formol, soit 6 x 10³ ufc/ μ l. Dilution adéquate pour obtenir 10⁴ bactéries par gramme de crevette en dose pure.

Comptages en gélose ZoBell après 24 heures d'incubation :

Comptages ufc/boite	Boite n°1	Boite n°2	Dilution n°1 / n°2
4042	162	166	4 / 4
AQ 63	116	181	5 / 5

Pourcentages de mortalité observés après 24 heures :

Pour la 4042 (Z1):

Dose "pure" : 50 % de mortalité dans les deux bacs.
Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Pour la AQ 63:

Dose "pure" : 90 % de mortalité dans les deux bacs.
Dose 1/10 : 10 % de mortalité dans les deux bacs.

Manipulation du 05/10/94

Matériel et méthodes

- **Bacs** : en fibre, de 250 l d'eau de mer, sans renouvellement d'eau, aération assurée par bulleur branché sur les conduites d'air sous pression. Désinfection du bac et de l'eau d'élevage par chloration, pendant deux jours.

- **Crevettes** : *Penaeus stylirostris* de 10 g de poids moyen, (écart type : 1,6 g), pêchées le 27/09/94, stockées dans deux bacs de 500 litres en circuit ouvert. Répartition des crevettes en lots expérimentaux dans les 250 litres la veille du challenge infectieux.

- **Souches bactériennes** : *Vibrio sp.*

W6, AQ 51.

- **Inoculum** : 40 μ l de suspension bactérienne. Bouillon initial de cinq heures de culture en ZoBell liquide. Pour chaque souche, deux dilutions en eau de mer stérile sont testées, la plus concentrée correspondant à une dose de 10⁵ bactéries par gramme de crevette, la deuxième correspondant au dixième de cette dose.

- **Estimation du nombre de bactéries injectées** : les comptages lors de l'infection sont effectués par lecture au microscope direct à contraste de phase du bouillon initial à l'aide d'une cellule de Mallassez, après dilution de moitié dans une solution de formol. On dilue alors ce bouillon de façon à obtenir une dose proche de celle choisie pour le challenge. Des boîtes de Pétri (en gélose ZoBell) sont ensemencées avec des dilutions successives de 10 en 10 des suspensions bactériennes injectées.

- **Vérification de la quantité de bactéries injectées** : comptage des unités formant colonies (ufc) sur des cultures de 24 heures en gélose ZoBell. Vérification de l'homogénéité entre les boîtes de comptage et avec les estimations Mallassez.

- **Injection intramusculaire de 40 μ l de l'inoculum bactérien** ainsi réalisé à l'aide d'une seringue à insuline (aiguille 0.5 x 16 mm, dont la longueur est limitée par un morceau de tuyau cristal). Deux lots séparés de dix crevettes chacun seront injectés pour chaque challenge testé.

Résultats :

Comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez :

Pour la W6, on compte **27.100 bactéries/mm³** dans le bouillon de départ, avec dilution 50% formol, soit 5.4 x 10⁴ ufc/ μ l. Dilution adéquate pour obtenir 10⁴ bactéries par gramme de crevette en dose pure.

Pour la AQ 51, **3500 bactéries/mm³** dans le bouillon de départ, avec dilution 50% formol.

Comptages en gélose ZoBell après 24 heures d'incubation :

Comptages ufc/boite	Boite n°1	Boite n°2	Dilution n°1 / n°2
W6	73	73	5 / 5
AQ 51	204	243	5 / 5

Pourcentages de mortalité observés après 24 heures :

Pour la AQ 51:

Dose "pure" : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Pour la W6:

Dose "pure" : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Manipulation du 12/10/94

- **Crevettes** : *Penaeus stylirostris* de 12 g de poids moyen, (écart type : 1,6 g), pêchées le 27/09/94, stockées dans deux bacs de 500 litres en circuit ouvert. Répartition des crevettes en lots expérimentaux dans les 250 litres la veille du challenge infectieux.

- **Souches bactériennes** : *Vibrio sp.*

W7, W6

Résultats du 12/10:

Comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez :

Pour la W7, on compte **22.000 bactéries/mm³** dans le bouillon de départ, avec dilution 50% formol, soit 4.4×10^4 ufc/ μ l.

Pour la W6 bis, on compte **19.800 bactéries/mm³** dans le bouillon de départ, avec dilution 50% formol, soit 3.9×10^4 ufc/ μ l.

Dilution adéquate pour obtenir 10^4 bactéries par gramme de crevette en dose pure.

Comptages en gélose ZoBell après 24 heures d'incubation :

Comptages ufc/boite	Boite n°1	Boite n°2	Dilution n°1 / n°2
W6 bis	89	114	5 / 5
W7	143	121	5 / 5

Pourcentages de mortalité observés après 24 heures :

Pour la souche W6 bis:

Dose "pure" : 0 % dans les deux bacs.

Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Pour la souche W7:

Dose "pure" : 10 % de mortalité dans un bac, 0 % dans l'autre bac.

Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Manipulation du 20/10/94

- **Crevettes** : *Penaeus stylirostris* de 14 g de poids moyen, (écart type : 1,6 g), pêchées le 27/09/94, stockées dans deux bacs de 500 litres en circuit ouvert. Répartition des crevettes en lots expérimentaux dans les 250 litres la veille du challenge infectieux.

- **Souches bactériennes** : *Vibrio sp.*

AF13, W6 2

Résultats du 20/10:

Comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez :

Pour la AF13, on compte **38.000 bactéries/mm³** dans le bouillon de départ, avec dilution 50% formol, soit 7.6×10^4 ufc/ μ l.

Pour la W6-2, les bactéries sont **en amas**, non comptables individuellement. On fera une injection de la suspension pure, et une diluée au dixième.

AF13: Dilution adéquate pour obtenir 10^4 bactéries par gramme de crevette en dose pure.

Comptages en gélose ZoBell après 24 heures d'incubation :

Comptages ufc/boite	Boite n°1	Boite n°2	Dilution n°1 / n°2
W6-2	38	80	4 / 4
AF 13	135	116	5 / 5

Pourcentages de mortalité observés après 24 heures :

Pour la W6-2:

Dose "pure" : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Pour la AF13:

Dose "pure" : 90 % de mortalité dans les deux bacs.

Dose 1/10 : 0 % de mortalité dans les deux bacs.

Manipulation du 09/11/94

- **Crevettes** : *Penaeus stylirostris* de 16 g de poids moyen, (écart type : 1,6 g), pêchées le /10/94, stockées dans deux bacs de 500 litres en circuit ouvert. Répartition des crevettes en lots expérimentaux dans les 250 litres la veille du challenge infectieux.

- **Souches bactériennes** : *Vibrio sp.*

1042, Isolée d'Aquamer

Résultats :

Comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez :

39.600 bactéries/mm³, soit environ 4×10^7 bactéries/ml de suspension pour le bouillon de départ. Dilution par cinq pour obtenir la dose "pure".

Comptages en gélose ZoBell après 24 heures d'incubation :

Comptages ufc/boite	Boite n°1	Boite n°2	Dilution n°1 / n°2
1042	132	129	5 / 5

Soit $3,26 \times 10^4$ cfu/g de crevette pour la dose pure, et $3,26 \times 10^3$ pour la dose 1/10.

Pourcentages de mortalité observés après 24 heures :

Dose "pure" : 100 % de mortalité dans les deux bacs.

Dose 1/10 : 100 % de mortalité dans les deux bacs.

Chronologie des survies observées:

	Heure d'observation	14 h	19h	22h	24h	07h30
"Dose" injectée	Temps relatif	T+2h	T+5h	T+8h	T+10h	T+17h30
Pure	10	9	9	7	4 (2 +/-)	0
Pure	10	7	7	5	4 (2 +/-)	0
1/10	10	9	9	9	8	0
1/10	10	9	9	9	7	0

Discussion :

Cette souche tue 100 % des animaux en moins de 24 heures à une dose trois fois inférieure à la DL_{50} de la Z1 ($1,6 \times 10^4$ /g de crevette, pour mémoire).

Manipulation du 16/11/94

- **Crevettes** : *Penaeus stylirostris* de 16 g de poids moyen, (écart type : 1,6 g), pêchées le 27/09/94, stockées dans deux bacs de 500 litres en circuit ouvert. Également *Penaeus indicus* (poids moyen des mâles: 12 g, poids moyen des femelles: 20 g). Répartition des crevettes en lots expérimentaux dans les 250 litres la veille du challenge infectieux.

- **Souches bactériennes** : *Vibrio sp.*

1042, Isolée d'Aquamer

Résultats du 16/11:

Comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez :

30.200 bactéries/mm³. Dilution adéquate pour obtenir 10^3 bactéries par gramme de crevette en dose pure.

Comptages en gélose ZoBell après 24 heures d'incubation :

Comptages ufc/boite	Boite n°1	Boite n°2	Dilution n°1 / n°2
1042	140	147	4 / 4

Soit $3,6 \cdot 10^3$ cfu/g de crevette pour la dose pure, et $3,6 \cdot 10^2$ pour la dose 1/10.

Pourcentages de mortalité observés après 24 heures :

Dose "pure" : - 100 % de mortalité dans les deux bacs d'*indicus*.

- 100 % de mortalité dans les deux bacs de *stylirostris*.

Dose 1/10 :

- 100 % de mortalité dans les deux bacs d'*indicus*.
- 100 % de mortalité dans les deux bacs de *stylirostris*.

Chronologie des survies observées:

Pour *Penaeus indicus*:

	Heure d'observation	10h	12h	13h	16h30	21h30	7h30	9h30	9h30
"Dose" injectée	Temps relatif (T0)	T+30mn	T+3h	T+4h	T+7h	T+12h	T+22h	T+24h	T+48h
Pure	10	10	10	9	9	3	0	0	0
Pure	10	10	10	10	10	3	0	0	0
1/10	10	10	10	10	10	9	0	0	0
1/10	10	10	10	10	10	8	1	0	0

Pour *Penaeus stylirostris*:

	Heure d'observation	10h	12h	13h	16h30	21h30	7h30	9h30	9h30
"Dose" injectée	Temps relatif (T0)	T+30mn	T+3h	T+4h	T+7h	T+12h	T+22h	T+24h	T+48h
Pure	10	10	10	10	10	10	0	0	0
Pure	10	9	9	9	9	9	1	0	0
1/10	10	10	10	10	10	10	2	0	0
1/10	10	10	10	10	10	10	1	0	0

Nous retiendrons de ces expériences, la redoutable pathogénicité de certaines souches bactériennes injectées par voie intramusculaire.

3-4-2 : pathologie expérimentale à partir d'entités ultrafiltrables

Compte tenu de la suspicion d'une origine virale du syndrome 93, sur la base des observations faites en histologie, des essais de reproduction expérimentale de la maladie ont été entrepris par baignation ou injection d'un ultra-filtrat de crevettes mourantes prélevées au cours d'épisodes aigus et stockées à -70°C. Ces expériences mettent en évidence le pouvoir pathogène d'entités ultrafiltrables présentes chez les individus moribonds. Toutefois, les compte rendus de ces expériences sont en cours de rédaction et feront l'objet d'un prochain rapport (R. Costa, communication personnelle).

4 ème partie : La question des traitements

Les traitements des maladies constituent une part importante de la démarche du vétérinaire. Parce qu'il s'agit d'espèces "nouvelles", parce qu'elles sont destinées à la consommation humaine dans des délais en général brefs, parce que leur élevage est en continuité avec l'environnement marin littoral, le traitement des espèces aquacoles ne saurait être abordé sans précautions. Force est de constater que pour la plupart des élevages de type industriel, les traitements, tant curatifs que préventifs, sont devenus un mal nécessaire. La distance qui sépare du milieu naturel du confinement des "batteries" oblige l'éleveur (au sens large) à consolider un système qu'il a fragilisé pour des raisons de production.

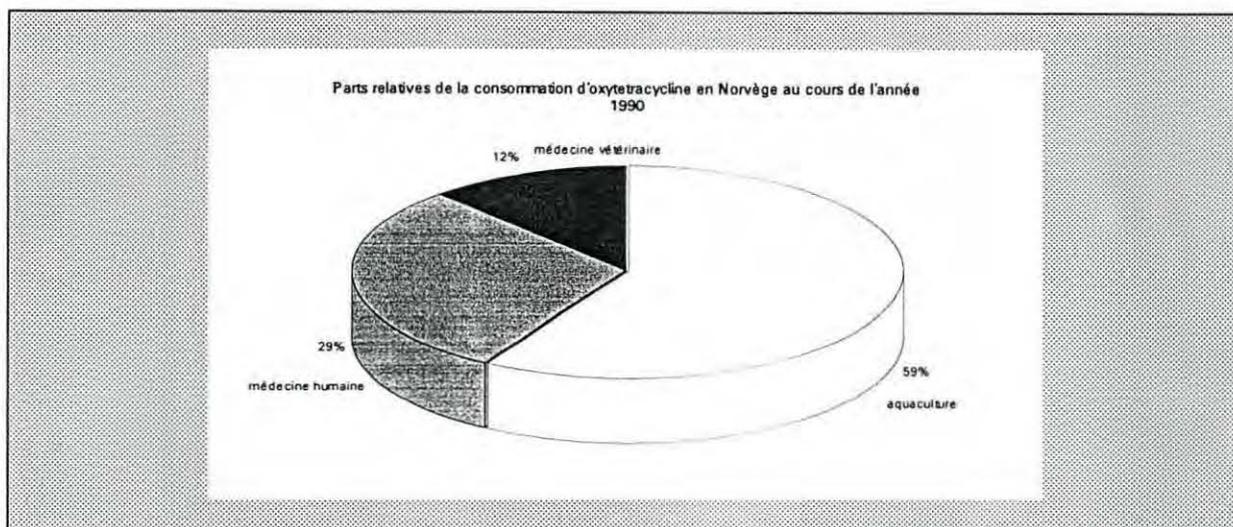
Les traitements, pour des espèces élevées en milieu semi-ouvert, posent les problèmes des quantités de substances à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans l'environnement et de ce fait, ne semblent pas constituer une voie d'approche à privilégier. Cependant, nous ne disposons que de peu de possibilités de protéger les espèces aquacoles vis à vis des maladies infectieuses, et l'urgence de la situation de certains bassins pourrait justifier la recherche de solutions à court terme.

4-1 : généralités sur les médicaments en aquaculture

Si l'on considère les maladies sous l'angle de leur traitement, il est possible de distinguer les maladies qui ne se traitent pas ou difficilement (virus, certaines bactéries), de celles qui peuvent l'être. En ce qui concerne la première catégorie, les mesures prophylactiques constituent l'approche classique des moyens de lutte. Cependant, l'aquaculteur fait face à des épisodes ponctuels auxquels il doit répondre rapidement. La nécessité et l'urgence de la réponse peuvent conduire à une mauvaise utilisation de produits pharmaceutiques, à un diagnostic hâtif et erroné et de toute façon à l'absence de toute prescription (de Kinkelin et Michel, 1992).

Les produits utilisés en pisciculture dès les années 20 étaient pour l'essentiel des désinfectants (formol, cuivre, vert malachite, NaCl) ; les antibiotiques (découverte de la pénicilline par Fleming en 1929) et les antibiominimétiques (synthèse des premiers sulfamides vers 1935) vont révolutionner la lutte contre les maladies infectieuses. La médecine vétérinaire et la pisciculture bénéficieront bien entendu de ces découvertes. Les premiers essais de lutte contre la furonculose remontent à 1945, utilisant avec succès du nitrofurale et de la sulfamérazine. Rapidement, l'emploi sera fait des sulfamides, des nitrofuranes, mais aussi du chloramphénicol et des tétracyclines, posant déjà le problème d'antibiorésistance, de résidus médicamenteux et de pollution de l'environnement. Compte tenu du nombre restreint d'antibiotiques disponibles sur le marché, ce sont toujours les mêmes qui sont utilisés, avec souvent un phénomène de mode (exemple des quinolones actuellement en France).

Les antibiotiques tiennent aujourd'hui une place de choix dans l'arsenal thérapeutique et sont parfois largement utilisés en aquaculture. Les éleveurs de saumon, en Norvège, ont utilisé jusqu'à 48 tonnes d'antibiotiques en 1987 dont 56% étaient de l'oxytétracycline. Il est intéressant de noter que ces chiffres précis sont permis par un recensement et un contrôle rigoureux des prescriptions des vétérinaires norvégiens spécialisés en aquaculture, ce qui n'est malheureusement pas le cas en France. Ce contrôle n'empêche pas l'utilisation des antibiotiques comme l'indiquent les statistiques de ce pays, mais permet plutôt leur utilisation rationnelle. Ainsi les quantités d'OTC utilisées en Norvège sont passées de 27 tonnes en 1987, à 18 tonnes en 88 puis 5 en 89, alors que l'acide oxolinique passait de 9 tonnes en 88 à 12 en 89, remplaçant progressivement la première (résistance plasmidique à l'OTC, posologie plus faible pour l'acide oxolinique). Quoique contrôlées, ces quantités d'antibiotiques restent énormes (50 tonnes en 1990) comparées aux 25 tonnes/an en médecine humaine et 10 tonnes/an en médecine vétérinaire!



Si l'absence de législation et l'utilisation incontrôlée d'antibiotiques conduit en général à n'utiliser que "ce qui a marché", sélectionnant à terme, les résistances à ce composé ; paradoxalement, une législation trop restrictive conduit au même écueil lorsqu'elle n'autorise l'utilisation que d'une ou deux substances. On voit ici la difficulté pour le législateur de se donner une attitude raisonnable en matière d'antibiothérapie.

C'est pourquoi, nous avons tenu à informer sur les bases légales de la pharmacie vétérinaire, responsabiliser les différents intervenants de la filière, organiser la filière afin de garantir tous ses membres de dérapages éventuels^d (anonyme (b), 1994).

La définition légale du médicament humain et vétérinaire est donnée par le code de la santé publique (CSP) : " on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ".

Le CSP précise que l'on entend par médicament vétérinaire tout médicament destiné à l'animal ; il distingue en outre quatre types de médicaments vétérinaires dont, la spécialité pharmaceutique pour usage vétérinaire, tout médicament vétérinaire préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale, le prémélange médicamenteux, tout médicament vétérinaire préparé à l'avance exclusivement destiné à la fabrication ultérieure d'aliments médicamenteux (on parle parfois de premix), l'aliment médicamenteux, tout mélange d'aliment et de prémélange médicamenteux et présenté pour être administré aux animaux sans transformation dans un but thérapeutique, préventif ou curatif.

Les immunostimulants, vaccins, antibiotiques, destinés au traitement des crevettes sont des médicaments vétérinaires. Leur utilisation est soumise à prescription vétérinaire.

Rappelons quelques règles concernant la pharmacie vétérinaire. L'importation de médicament ou prémélange médicamenteux est soumise à une autorisation administrative d'importation. Cette autorisation est attribuée

^d Une réunion s'est tenue le Jeudi 29 Septembre 1994, dans les bureaux IFREMER à Nouméa afin d'évoquer quelques uns des aspects de cette question. Cette réunion conviait les différents acteurs de la filière pénéides, éleveurs, providiers, transformateur, Vervice Vétérinaire, un importateur de médicaments vétérinaires, Laboratoire Vétérinaire et organisme de recherche (étaient présents : Dr. Carton (DAF), Dr. Costa (LTDV), Mlle Mermoud (CIRAD-LTDV), M. Palladin (C3C), Dr. Paret (Proveto), M. Goxe (Seafarm), M. Postic (Aquamer), Mlle Darzacq (Moulins de St Vincent), Mme Favreau (SOPAC), M. Favreau (Aquamer), M. Galinié (GIE-RA IFREMER) et F. Berthe (GIE-RA IFREMER)).

uniquement à un pharmacien ou un vétérinaire. Elle concerne tout médicament ou pré mélange médicamenteux. Les conditions d'attribution sont liées à l'existence d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou autre agrément (type Food and Drug Administration) ; les Services Vétérinaires auront recours en certains cas à l'avis des personnes compétentes en la matière.

L'AMM est accordée au fabricant lorsque celui-ci justifie :

- qu'il a fait procéder à la vérification de l'innocuité du produit dans les conditions normales d'emploi et de son effet thérapeutique, à la détermination du temps d'attente ainsi qu'à son analyse qualitative et quantitative,
- qu'il dispose effectivement d'une méthode de fabrication et de procédés de contrôle de nature à garantir la qualité du produit au stade de fabrication en série.

Il faut entendre par temps d'attente le délai à observer entre l'administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal, pour garantir que ces denrées ne contiennent pas de résidus pouvant présenter des dangers pour la santé du consommateur.

Trois catégories de risques pour la santé humaine liés à l'utilisation de médicaments en aquaculture, peuvent être distinguées (Bernoth, 1991) :

- résidus médicamenteux dans la chair des animaux destinés à la consommation humaine,
- développement de résistance chez des bactéries pathogènes pour l'homme,
- effets toxiques directs de ces produits sur l'homme.

Une AMM ne limite en rien les risques inhérents à l'utilisation d'une molécule ; du moins ces risques ont-ils été évalués et les conditions d'utilisation définies afin de garantir utilisateur, patient, consommateur et environnement du risque minimal. L'AMM est en effet accordée au fabricant lorsque celui-ci justifie qu'il a fait procéder à la vérification de l'innocuité du produit dans les conditions normales d'emploi et de son effet thérapeutique, à la détermination du temps d'attente ainsi qu'à son analyse qualitative et quantitative ; d'autre part qu'il dispose effectivement d'une méthode de fabrication et de procédés de contrôle de nature à garantir la qualité du produit au stade de fabrication en série.

Les Services Vétérinaires ont par ailleurs pour mission de s'assurer au sein de la profession vétérinaire du respect de la déontologie. Ce code de bonne conduite prévoit notamment la délivrance de médicament sur prescription, et prescription dans le cadre unique de la clientèle. Le respect des règles sur la distribution des médicaments vétérinaires est donc aussi du ressort des Services Vétérinaires.

Enfin, cette administration a pour rôle de s'assurer de l'absence de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale ; ce dernier volet est de toute première importance, on le comprend, pour une filière essentiellement tournée vers l'exportation.

Il existe donc un cadre légal à l'importation, à la distribution et au contrôle des médicaments vétérinaires. Le prescripteur est aujourd'hui un chaînon manquant en Nouvelle Calédonie.

4-2 : les antibiotiques

4-2-1 : données relatives à l'oxytétracycline

Deux molécules destinées au traitement de l'espèce Poisson ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France, qui sont l'acide oxolinique et la flumequine. La majorité des produits utilisés n'a donc pas d'AMM (tétracyclines, chloramphénicol, nitrofuranes, sulfamides, etc...), ce qui explique l'emploi fréquent de médicaments vétérinaires destinés à d'autres espèces animales, Debernardi, 1992. Le travail sur l'OTC est donc "hors la loi".

Cependant, trois antibiotiques ont aujourd'hui obtenu un agrément en aquaculture aux Etats Unis : tétracyclines (Terramycine®), sulfamerazine (ce produit n'est plus disponible auprès du fabricant), et l'association sulfadiméthoxine/ormetoprime (Romet®), Dixon, 1994. Les travaux d'études concernant l'approbation de l'utilisation de l'oxytétracycline en aquaculture aux Etats Unis, remontent environ à 1977 (Bell, 1992), et sont

encore menés à l'heure actuelle. Seul l'extrême sérieux apporté par la Food and Drug Administration (FDA) et l'Environmental Protection Agency (EPA) à ce type de dossier d'agrément nous autoriserait à travailler sur l'oxytétracycline, en dehors donc de tout cadre légal.

parmi les antibiotiques utilisés en aquaculture, l'oxytétracycline tient une place prépondérante due à un spectre d'activité très large, à une faible toxicité et surtout à un coût très faible, élément de choix prépondérant pour l'éleveur. Bien qu'elle tende à être supplantée par les quinolones, notamment pour des raisons de résistance, son utilisation reste fréquente.

L'oxytétracycline est produite par un champignon, *Streptomyces rimosus*, elle possède la structure commune des tétracyclines à savoir le noyau naphhtacène, deux fonctions acides, une fonction carboxamide et un groupement diméthylamine basique. L'oxytétracycline est plutôt hydrosoluble. Le chlorhydrate de tétracycline est relativement peu stable à la lumière, son caractère amphotère lui permet une répartition intra et extra cellulaire, elle possède des propriétés chélatrices des cations bivalents, trivalents ou alcalino-terreux très prononcées. Cette activité chélatrice est importante en milieu marin compte tenu de la présence de Ca^{++} et Mg^{++} dans l'eau de mer. L'activité antibactérienne de l'OTC est de type bactériostatique (ralentissement de la prolifération bactérienne) par un effet inhibiteur des synthèses protéiques (fixation sur la sous unité 30 S des ribosomes bactériens par formation d'un chélate avec le magnésium déjà fixé au niveau des nucléotides des ARN ribosomiaux)

L'OTC possède un spectre d'activité très large. Les germes de la famille des *Vibrionaceae* y sont en général sensibles (*Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, etc...). Cet antibiotique a de même été utilisé avec succès dans la lutte contre des organismes de type rickettsies, mycoplasmes etc... Les résistances à l'OTC sont essentiellement plasmidiques, transférables et souvent croisées et multiples.

La voie orale comme voie d'administration par un aliment médicamenteux représente, et de loin, la solution de choix pour le traitement des crevettes en période de grossissement, puisque permettant de traiter un nombre important d'animaux sans manipulation supplémentaire. Cependant, un certain nombre d'inconvénients sont inhérents à cette voie : la nécessité d'une resorption digestive suffisante afin que la concentration tissulaire soit efficace, le problème de l'inappétence du produit, la perte d'appétit des individus malades qui ne seront donc pas traités, les comportements hiérarchiques qui font que les dominants consomment plus d'aliment médicamenteux que les dominés, la dissolution rapide des substances hydrosolubles avant ingestion par les animaux, évaluation approximative de la biomasse traitée. C'est pourquoi, on recommande en général de traiter rapidement (afin de limiter le nombre des individus déjà atteints), après une période de jeûne (d'environ douze heures en général) et en rationnant les animaux à un taux inférieur au taux habituel (1%). L'intervention rapide est capitale pour la réussite d'un traitement antibiotique (frapper vite, fort et longtemps) ; elle peut même et en certains cas doit, précéder le retour des résultats du laboratoire diagnostique (ceux-ci restent cependant indispensables pour justifier d'un traitement).

La règle d'or en matière d'antibiothérapie peut s'énoncer ainsi : frapper vite, fort et longtemps. La précocité d'intervention, nous l'avons vu, est capitale pour le succès du traitement ; des doses suffisantes et appliquées sur une durée suffisamment longue conditionnent de même la réussite d'une antibiothérapie bien menée.

Il faut entendre par temps d'attente le délai à observer entre l'administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal, pour garantir que ces denrées ne contiennent pas de résidus pouvant présenter des dangers pour la santé du consommateur. Nous avons opté en ce qui concerne l'OTC pour des temps d'attente raisonnablement longs (de l'ordre de trois semaines).

Un aspect non négligeable des traitements antibiotiques en aquaculture est leur impact direct sur l'environnement ; notamment par la persistance de la molécule utilisée dans les sédiments aquacoles. Cette persistance peut atteindre plusieurs semaines. Des doses capables d'effets antimicrobiens ont été détectées 12 semaines après traitement, Jacobsen et Berglund (1988). Ces auteurs estiment la demi-vie de l'OTC dans les sédiments à 10 semaines! Björklund *et al.* (1990) montrent qu'en fonction des conditions d'évolution de ces sédiments (anaérobiose), les demi-vie de l'OTC peuvent varier de 9 à 419 jours. En outre, des résidus d'OTC sont détectés dans les poissons sauvages à proximité des sites de traitement jusqu'à 13 jours après traitement.

☞ Le choix de mener les premiers essais de traitement antibiotique par l'oxytétracycline répondait donc à un certain nombre de critères ; notamment son usage classique et parfois recommandé en aquaculture, l'agrément donné à cette molécule par l'administration des Etats Unis pour son usage en aquaculture, son efficacité théorique sur les germes isolés, son faible coût pour les producteurs et sa disponibilité rapide sur le Territoire.

Les tristes expériences de la salmoniculture écossaise ou norvégienne doivent nous rappeler le danger et les limites de ce type de solution à terme.

4-2-2 : approche expérimentale :

Notre approche expérimentale devait tenir compte du peu de données relatives à l'utilisation de l'OTC en pénéculture tropicale. C'est pourquoi, les expériences suivantes ont été envisagées^d :

sensibilité de Vibrio spp. à l'oxytétracycline

Le choix d'une molécule est en effet établi à partir des données de sensibilité des souches de bactéries à la molécule envisagée. Ces données sont obtenues sur quelques souches isolées en élevage et pour lesquelles sont réalisés antibiogrammes et mesures de CMI.

contrôle de l'incorporation de la molécule dans un aliment médicamenteux

Le taux d'incorporation de la molécule à l'aliment est mesuré par dosage de la molécule en méthode spectrophotométrique à partir d'une quantité connue d'aliment. Le taux recommandé est de 3 à 5 %, selon les auteurs.

L'aliment médicamenteux préparé est testé vis-à-vis de sa tenue à l'eau par dosage en HPLC de l'antibiotique dans l'eau où séjourne l'aliment maintenu dans une étamine ; la mesure est faite à intervalles de temps successifs.

consommation de l'aliment médicamenteux

La consommation de l'aliment est évaluée au cours des traitements de bassins par recherche de restes sur le fond des bassins ou sur plateaux mangeoires. En unité expérimentale, sur fond artificiel, la consommation est également suivie. Le taux d'incorporation de l'OTC par les animaux est évalué par dosage de l'OTC dans divers tissus en méthode HPLC.

essais de traitement des animaux

Un certain nombre de lots d'animaux ont subi un traitement à l'OTC, soit en bassin de grossissement, soit en unité expérimentale ; les taux de survies de ces lots sont comparés à ceux de lots témoins non traités et élevés dans des conditions égales par ailleurs. La résistance des animaux à un stress est envisagée comme critère d'évaluation de santé. D'autre part, une évaluation de la bactériémie des animaux est permise par la mise en culture d'un goutte d'hémolymphe. Le traitement est appliqué conformément aux recommandations de divers auteurs pendant une période de 10 jours, suivie éventuellement d'une nouvelle période de 10 jours à quelques semaines d'intervalle. Un temps d'attente de 21 jours (trois semaines) est recommandé avant abattage des animaux destinés à la consommation humaine. Des prélèvements de sol et d'eau au cours de ces traitements ont été faits afin de pouvoir mesurer les quantités d'OTC dans ces compartiments des bassins ; les mesures sur ces échantillons ne sont pas encore disponibles.

4-2-3 : résultats relatifs aux essais OTC

sensibilité des souches de Vibrio spp. isolées à l'OTC

Des antibiogrammes avaient été réalisés sur des pools de souches bactériennes isolées d'animaux destinés à un traitement antibiotique qui avaient montré la sensibilité de celles-ci à l'OTC avant les traitements par cette molécule (R. Costa, communication personnelle).

^d le détail du matériel et des méthodes utilisés dans ces expériences est donné en annexe (annexe n° 2).

Des antibiogrammes ont été réalisés pour 13 souches bactériennes en grossissement (SF2, W1, W8, AQ61, AQ16, AQ55, S2, AQ38 et SF35 qui toutes étaient résistantes, AQ51, 63, 66 et AF13 sont sensibles), et 18 souches bactériennes en éclosion (M1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20) dont 11 sensibles, 1 intermédiaire et 6 résistantes^d.

Les mesures de CMI ont été réalisées pour 5 souches bactériennes (AF13, W3, AQ66, AQ63 et SF37) pour lesquelles les résultats sont compris entre 0,1 et 1 mg/ml.

contrôle de l'incorporation de la molécule dans un aliment médicamenteux

Les premières mesures faites ont pour but de valider le protocole d'extraction de l'OTC à partir de l'aliment ; 40% de la molécule ne passent pas dans l'eau d'extraction et restent fixés à l'aliment.

Les dosages d'OTC réalisés sur l'aliment médicamenteux préparé initialement à 3 mg/g ont donné des valeurs comprises entre 1,5 et 2,1 mg d'OTC / g de granulé. L'incorporation de 5 kg d'antibiotique par tonne d'aliment a permis d'atteindre des taux compris entre 3,7 et 4,9 mg/g de granulé. Ce dernier, en accord avec les recommandations trouvées dans la littérature a été utilisé dans les essais de traitement des animaux.

Après 30 minutes de séjour dans l'eau, 83% de l'OTC restent liés à l'aliment (6,7 mg d'OTC ayant diffusé par litre d'eau de mer), 67% après 1 heure de séjour (13 mg/l), et enfin, 55% après 2 heures (18,3 mg/l).

consommation de l'aliment médicamenteux

Les mesures d'OTC tissulaire (muscle et glande digestive) ont été faites après traitement de 10 jours sur des animaux des bassins 2, 3, 10 de Seafarm, du bassin 10 de la SASV2, ainsi qu'en unité expérimentale, bassin de scobalite où les animaux sont nourris de façon fractionnée. Ces mesures ont donné les valeurs consignées dans le tableau n°V.

A l'issu de la période de trois semaines recommandée, les concentrations résiduelles d'OTC mesurées par HPLC, dans le muscle des animaux destinés à la consommation humaine, issus des bassins 2, 3, 10 de Seafarm, et du bassin 10 de la SASV2, étaient inférieures à la limite de détection de l'appareil (<0,1 mg/ml).

tableau n°V : dosage de l'OTC tissulaire de crevettes après 10 jours de traitement

bassin d'origine	quantité d'OTC dans le muscle,	dans l'hépatopancréas
2	0,54 mg/ml	2,56 mg/ml
3	0,36 mg/ml	1,15 mg/ml
10	0,22 mg/ml	0,56 mg/ml
9 (témoin)	0 mg/ml	0 mg/ml
10 SASV2	1,9 mg/ml	7 mg/ml
scob SASV	1,36 mg/ml	8,77 mg/ml

Le suivi de consommation sur mangeoires a été réalisé lors du traitement des crevettes du bassin 10 de la SASV2. Les fiches d'élevage signalent qu'aucuns restes d'aliments n'étaient retrouvés sur ces mailles ; ces observations corroborent pour ce bassin, celles faites sur le fond du bassin lui-même lors des plongées d'inspection

^d des antibiogrammes ont plus récemment été réalisés sur deux souches considérées comme pathogènes (AM 23 et Z 1) et ont montré la résistance de celles-ci à l'OTC.

essais de traitement des animaux

Les données zootechniques relatives aux essais de traitements réalisés sur les bassins de la ferme Seafarm sont présentés par le tableau n°VI.

L'observation quotidienne de la mortalité sur ces bassin permet de dire que celle-ci est limitée lors des périodes de traitement des animaux par l'OTC.

tabl. n°VI : données zootechniques relatives aux élevages Seafarm traités par l'oxytétracycline

bassin	traité	le :	par :	le :	par :	date début	densité PL/m2	survie à 70j*	survie 100j*	survie 140j*	survie finale
2	OTC	28/07	750kg	27/08	780kg	26/05	36	75%	62%	45%	34%
3	OTC	27/07	930kg	27/08	930kg	14/04	39	40%	30%	26%	20%
10	OTC	27/07	600kg	27/08	690	27/05	29	80%	65%	45%	34%
9	témoin	-	-	-	-	27/05	29	75%	63%	45%	34%

* les survies annoncées à 70, 100 et 140 jours sont des estimations faites par l'éleveur lui-même ; la survie finale est établie après pesée des animaux pêchés en fin d'élevage.

prévalence de *Vibrio spp.* dans l'hémolymphe des crevettes après traitement de 10 jours : bassin 2 : 4 crevettes à hémolymphe stérile/20 ponctions réalisées ; bassin 3 : 6/20 ; bassin 9 : 10/20 et bassin 10 : 4/20.

Le bassin 10 de la SASV2, surface de 2800 m², avait été choisi pour fournir les sujets des expériences menées à la station en raison d'une mortalité chronique exprimée, de type "syndrome 93", cf figure n°3. A diverses reprises, des transferts d'animaux, suivis d'un taux anormalement élevé de mortalité chez ceux-ci, avaient montré leur extrême sensibilité à toute nature de stress.

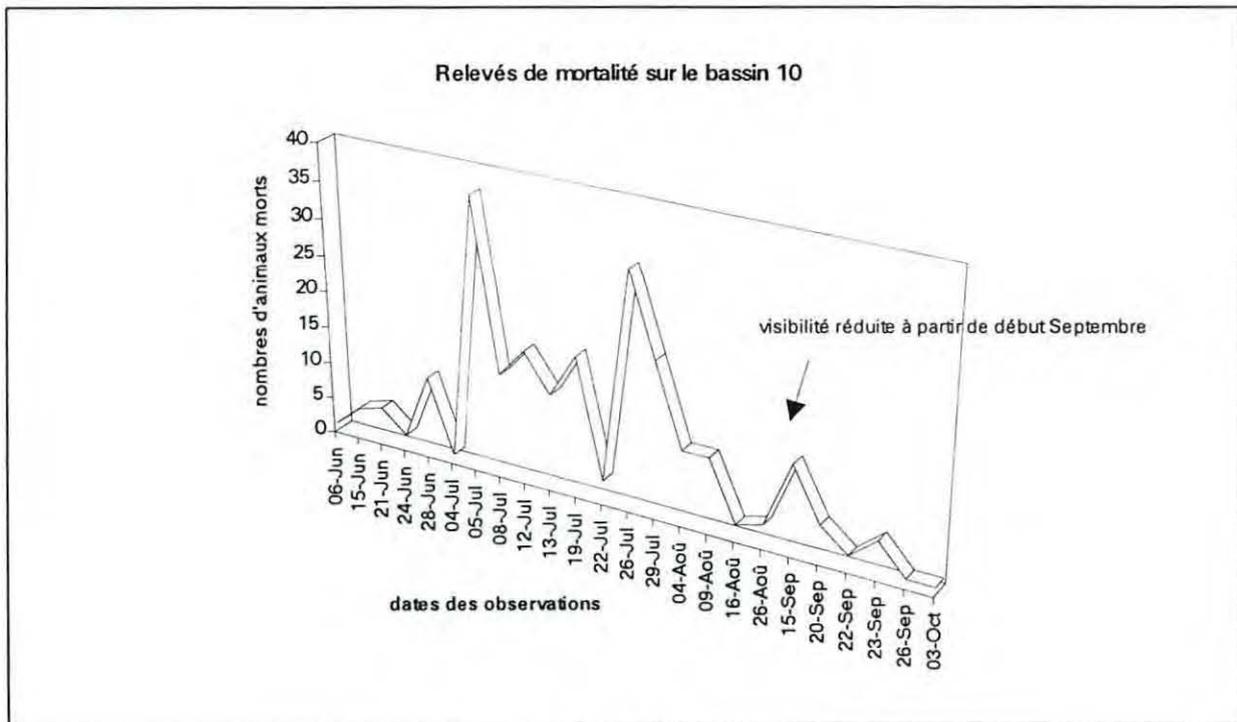


figure n° 9

Cet élevage porte le numéro 276 de la SASV. Ce bassin de l'ex-ferme Chevalier en était à son deuxième élevage. La durée de l'assec avait été de 21 jours. L'ensemencement de 103 500 post-larves, issues de l'écloserie de Montagnès (P30) a eu lieu le 29 04 94, soit donc avec une densité initiale de 36,96 animaux/m². Elevage de type direct, avec aérateur. Les caractéristiques de la récolte (24/25 Novembre 1994) sont les suivantes : durée : 210 jours - passage au g : 42 jours - survie : 24,3% - charge : 223 g/m² - densité : 8,98 animaux/m² - poids final : 24,36 g - croissance : 0,139 g/j - indice conversion : 2,88 - aliment : 1797,9 kg (SICA) - rendement : 3873 kg/ha/an.

La mortalité observée en plongée, dans le bassin lui-même, est donnée par la figure n°9 (à partir du 13 09 94, il est noté une mauvaise visibilité en plongée liée à la turbidité de l'eau, et donc une certaine difficulté à relever les cadavres des animaux morts).

En unité expérimentale, des transferts à partir du bassin 10 SASV2 ont été réalisés (en général en duplicats). Les données relatives à ces transferts sont consignées dans le tableau n° VII.

tableau n°VII : survie des animaux transférés à partir du bassin 10 de la SASV2

date du transfert :	transfert A :	transfert B :
17 Août 1994	7/15 crevettes mortes	6/13 crevettes mortes
28 Septembre 1994	11/21 crevettes mortes	12/21 crevettes mortes
07 Octobre 1994	9/20 crevettes mortes	3/20 crevettes mortes
17 Octobre 1994	1/20 crevettes mortes	0/20 crevettes mortes
04 Novembre 1994	10/20 crevettes mortes	9/20 crevettes mortes
07 Novembre 1994	14/20 crevettes mortes	pas de transfert
14 Novembre 1994	8/20 crevettes mortes	9/20 crevettes mortes
18 Novembre 1994	8/20 crevettes mortes	9/20 crevettes mortes

4-2-4 : discussion

sensibilité des souches de Vibrio spp. isolées à l'OTC

Nous avons vu que l'oxytétracycline avait été et était encore largement utilisée pour le traitement des maladies d'origine bactérienne en aquaculture. Ce constat a bien entendu conditionné le choix de cette molécule (anonyme (a), 1994), conforté par un certain nombre de recommandations (Frelier, 1994). Cet antibiotique figure, d'autre part, dans la liste des molécules recommandées pour le traitement des vibrioses des pénéides (Lightner, 1988).

Les germes du genre *Vibrio* sont en général sensibles à l'OTC. Les résultats obtenus par Baticados *et al.* (1990) vont dans ce sens puisque 100% des souches de *V. harveyi* et *splendidus* isolées en élevage de *P. monodon* y sont sensibles. Dans notre étude, seules quatre souches parmi les treize isolées en bassin de grossissement testées au LTDV ont montré une sensibilité à l'OTC. Les résultats d'antibiogrammes réalisés sur des pools de souches sont délicats à interpréter et restent très approximatifs du fait de la difficulté à obtenir une suspension d'inoculation homogène, de rapports de promotion, compétition, inhibition entre souches sur une même gélose, vitesses de croissance différentes, etc... Dans notre étude, seules quatre souches parmi les treize isolées en bassin de grossissement testées au LTDV ont montré une sensibilité à l'OTC.

Les souches incluses dans l'étude de Baticados montrent des CMI de l'ordre de 50 mg/ml ; les CMI calculées des 5 souches calédoniennes se situent, nous l'avons dit, entre 0,1 et 1 mg/ml, soit 50 fois inférieures, ce qui signifierait une plus grande sensibilité de nos souches. Une précédente étude (Takahashi *et al.*, 1985) donnait des valeurs inférieures à 12,5 mg/ml. Dans ce travail, 77,6% de la population bactérienne avaient une CMI inférieure à 0,4 mg/ml, et 22,4% de cette population entre 6,3 et 12,5 mg/ml. Le nombre limité de mesures de CMI dont nous

disposons actuellement ne nous permet pas ce luxe de détails. Il est intéressant de noter les écarts importants dans les valeurs trouvées par ces auteurs et donc de sensibilité des souches bactériennes à un antibiotique.

Soulignons cependant que la sensibilité à l'OTC n'est pas recherchée sur les représentants d'un agent pathogène identifié mais bien plutôt sur ceux d'un genre bactérien (*Vibrio*), présumé responsable du syndrome 93. Il est possible dès lors de s'interroger sur la portée de ces quelques résultats.

La sensibilité de l'agent pathogène à la molécule que l'on se propose d'utiliser pour l'éliminer est bien entendu une condition *sine qua non* de la réussite du traitement. Cinq mesures de CMI, treizes résultats d'antibiosensibilité ne sont pas suffisants pour attester de cette sensibilité. Il serait donc intéressant de multiplier, sur chaque site, le nombre des antibiogrammes et CMI afin de préciser la sensibilité de nos souches de *Vibrio* à l'oxytétracycline, entre autre, les données disponibles actuellement étant trop parcellaires.

Ce travail permettrait de constituer pour chaque élevage une référence avant tout traitement, d'envisager une antibiothérapie raisonnée, de permettre un suivi du développement de résistances.

contrôle de l'incorporation de la molécule dans un aliment médicamenteux

Si la consommation de l'aliment est primordiale pour la réussite d'un traitement *per os*, il en va de même de la qualité de l'aliment lui-même. Il faut entendre par là la quantité d'antibiotique effectivement incorporée au granulé mais aussi le maintien de cette quantité lors du séjour dans l'eau du granulé avant sa consommation par les animaux.

Nos mesures montrent que ces points peuvent constituer des écueils réels au traitement : taux mesurés compris entre 3,7 et 4,9 mg d'OTC/g d'aliment au lieu de 5 ; ces résultats constituent cependant une réelle amélioration des taux de 1,5 et 2,1 au lieu de 3 mg d'OTC/g d'aliment recommandés initialement. Les approximations se succèdent quant à la biomasse du bassin, à la quantité d'aliment qui sera consommée, à la quantité d'antibiotique présent dans le granulé au moment de sa consommation etc... Cet ensemble d' "à peu près" rend aléatoire le traitement effectif, à la dose prescrite de l'ensemble des animaux. Il est important de rester rigoureux sur les points où cela est possible, notamment au moment de la fabrication de l'aliment médicamenteux.

Dans le même ordre d'idées, il a été enregistré une perte de l'ordre de 33% du principe actif après un séjour d'une heure sur le fond du bassin. C'est dans cet esprit, d'ailleurs, qu'il est recommandé d'utiliser des formes peu solubles d'OTC (TM-100 ou 50 de chez Pfizer, Frelier, 1994). Les observations faites lors du premier traitement sur le site de Seafarm montraient des restes non consommés de granulés six heures après distribution. Les quantités résiduelles d'OTC dans ces restes peuvent être considérées comme extrêmement faibles, en tous cas trop faibles pour traiter les animaux qui les consomment.

Quantités faibles mais non négligeables : en effet, l'utilisation de doses sub-inhibitrices d'antibiotiques - même si l'on a pu montrer leur intérêt lors du traitement de certaines infections, Desnottes (1993), Berthe (1994) - constitue un risque majeur d'apparition et de développement de résistances bactériennes. C'est pourquoi la règle dit frapper fort! Ces résistances peuvent apparaître rapidement après utilisation d'antibiotiques, comme le montrent les études de Hjeltness *et al.* (1987) pour *V. salmonicida* en Norvège, ou Aoki *et al.* (1985) pour *V. anguillarum* au Japon. Bien souvent, il s'agit de résistances multiples à support plasmidique ; ces résistances constituent une lourde hypothèque, on le comprend, sur les traitements antibiotiques ultérieurs des animaux. Nous avons vu que l'un des risques liés à l'utilisation d'antibiotiques en aquaculture était le développement de résistance chez des bactéries pathogènes pour l'homme. Ces résistances peuvent effectivement être transmises à des germes pathogènes pour l'homme comme le montrent Mc. Phearson *et al.* (1991) pour *Plesiomonas shigelloides* et *Aeromonas hydrophila*, directement liées à l'utilisation d'antibiotiques en élevages aquacoles.

C'est pourquoi, la forme pharmaceutique de la molécule choisie pour traiter, son taux d'incorporation à l'aliment, la tenue à l'eau de cet aliment médicamenteux, le taux de rationnement, la séquence de distribution doivent être envisagés avec le plus grand soin : ils conditionnent en effet les chances de succès de l'antibiothérapie par voie orale sur les grands effectifs.

consommation de l'aliment médicamenteux

Le fait de traiter des animaux par voie orale comporte un risque, puisque la réussite du traitement est conditionnée par la consommation du support de la molécule, aliment ou comprimé. Ce risque est amplifié lorsque les animaux traités sont affaiblis, et donc s'alimentent moins voire plus du tout, ou encore que la période de traitement (saison froide notamment) correspond à une réduction générale d'activité. Les pratiques du jeûne préalable, de l'incorporation de molécules attractantes, ou encore du sous rationnement pendant le traitement permettent bien souvent de palier ces difficultés. Le fait de ne pouvoir contrôler la prise effective du granulé médicamenteux laisse cependant une zone d'ombre. Ce contrôle est possible sur plateaux mangeoires et permet d'évaluer la consommation.

Ce suivi de consommation sur mangeoires a été réalisé lors du traitement des crevettes du bassin 10 de la SASV. Les fiches d'élevage signalent qu'aucun restes d'aliments n'étaient retrouvés sur ces mailles ; ces observations corroborent pour ce bassin, celles faites sur le fond du bassin lui-même lors des plongées d'inspection (un marqueur de consommation, coloration particulière du tube digestif par exemple, pourrait être utilisé pour un contrôle individuel lors d'échantillonnages). La consommation de l'aliment apparaît donc comme satisfaisante et ce malgré une mortalité chronique enregistrée sur le bassin (cf figure n° 9), c'est à dire un affaiblissement probable des animaux, et une certaine difficulté à évaluer la biomasse du bassin. La remontée des températures à cette période de l'année peut expliquer cette consommation de l'aliment médicamenteux. Des comportements hiérarchiques peuvent de même expliquer en partie ce résultat ; une partie de la population se porte bien et mange, l'autre s'éteignant progressivement.

La durée de traitement recommandée classiquement dans la littérature est de 10 jours ; selon certains auteurs cependant les concentrations tissulaires atteintes ne sont pas suffisantes pour affecter *Vibrio spp.*, si l'on ne traite pas pendant 3 semaines, Brown *et al.* (1992). Rappelons la règle d'or de l'antibiothérapie : frapper vite, fort et longtemps.

Les mesures d'OTC tissulaires réalisées sur les animaux des bassins au dixième jour de traitement révèlent des quantités variables de 0,22 à 1,9 mg/ml dans le muscle et 0,56 à 8,77 mg/ml dans l'hépatopancréas. Nous avons discuter des facteurs pouvant expliquer de telles variations. Il est intéressant de noter cependant que les valeurs élevées d'OTC tissulaires obtenues en unité expérimentale (bassin scob SASV, tableau n° V) l'ont été simultanément à la période de traitement des bassins 2, 3, et 10 de Seafarm, mais avec un rationnement fractionné. Le fractionnement et le contrôle de consommation permis par les "moulinettes" explique peut-être ce résultat.

Les recommandations faite par l'administration norvégienne (Goebbels, 1992) en ce qui concerne l'OTC utilisée pour le traitement des poissons font état d'un délai de 60 jours ; ce délai passe de 60 à 180 jours lorsque la température de l'eau passe de 12°C à 8°C ! L'influence de la température sur l'élimination d'un antibiotique est bien sûr de toute première importance pour un organisme poïkilotherme. En théorie, les temps d'attente imposés aux poissons sont applicables ; cependant, les particularités de physiologie des crustacés, ou les températures d'élevage rendent particulièrement hasardeuses les extrapolations. Selon les doses appliquées, la persistance de l'OTC chez les crevettes est de 3 à 15 jours, Brown *et al.*, 1992.

Dans les expériences menées en Nouvelle-Calédonie, un délai de 21 jours (soit trois semaines) a été choisi ; ce délai, compte tenu des données qui précèdent, peut paraître excessif surtout si l'on considère le caractère tropical de notre production et donc des températures élevées de l'eau des bassins. Les mesures réalisées à l'issu de ce temps d'attente montrent en effet des concentrations tissulaires inférieures à 0,1 mg/ml d'échantillon.^d

^d Cette valeur correspond en fait à la limite de détection de l'appareil de mesure. Ce seuil de détection relativement élevé est dû au fait que le protocole d'extraction et de dosage de l'OTC a été conçu pour une évaluation des concentrations tissulaires au cours du traitement ; il ne s'agissait donc pas par cette méthode de déterminer une concentration résiduelle d'antibiotique dans ces mêmes tissus. L'utilisation d'une boucle d'injection de volume supérieur permettrait entre autre bien entendu d'élever le seuil de détection de l'OTC. Au demeurant, diverses méthodes existent, microbiologiques notamment, spécifique de ce type de recherches (résidus antibiotiques), et certainement moins onéreuses. Le dosage de l'OTC par méthode HPLC selon le protocole utilisé ici, n'est pas adapté à la recherche de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale.

La question des résidus antibiotiques dans la chair des crevettes est de toute première importance. L'expansion de la pénéculture au cours des années 80 dans la zone tropicale, et l'intensification des méthodes de production, parfois de manière incontrôlée, ont favorisé l'impact des maladies ; le quasi anéantissement de la production taiwanaise en 1988 en est un exemple, Brown *et al.*, 1992. Redoutées, ces maladies sont le prétexte à des suradministrations d'antibiotiques, parfois de façon préventive. En pratique, nous l'avons vu, il n'existe pas de législation sur les délais d'attente. Une étude préliminaire, menée par la technique de Charm à l'Université de Stirling, montre la présence de résidus d'OTC sur des lots de crevettes congelées en provenance de divers pays producteurs (Equateur, Thaïlande...). Les autorités sanitaires de certains pays commencent à s'inquiéter de cette existence possible de résidus ; le Japon a décidé de contrôler systématiquement les importations d'origine taiwanaise.

Plus que l'utilisation elle-même d'un antibiotique, c'est la pertinence de cette utilisation qui est mise en cause.

En ce qui concerne nos essais, il est évident que les analyses en chromatographie haute performance telles qu'elles étaient conçues ne répondaient pas aux contraintes de la recherche de résidus. Si l'utilisation de l'OTC devait se faire, une structure de contrôle - basée sur des méthodes microbiologiques compte tenu de leur facilité d'exécution et de leur faible coût - et de recherche de résidus devrait voir le jour. Cette structure n'existe pas aujourd'hui.

Le délai d'attente particulièrement long que nous nous étions imposé, l'absence de traces d'OTC dans les crevettes traitées à l'issue de ce temps nous permettent cependant de penser que ces animaux, commercialisés, l'ont été en accord avec les règles sanitaires appliquées pour d'autres espèces animales, garantes de la sécurité des consommateurs.

essais de traitement des animaux

Au vu des résultats d'élevages des bassins traités par l'OTC, bassins 2, 3, et 10 de Seafarm, bassin 10 SASV2 - si l'on se réfère à la survie globale dans chacun de ceux-ci - il apparait un point commun entre ces élevages : de mauvais taux de survie. La conclusion bien entendu à laquelle conduit ce constat est celle d'un échec de l'OTC à juguler l'infection à *Vibrio* (rappelons que cela suppose effectivement une infection à *Vibrio*). Quoiqu'il en soit, notons que le traitement du bassin 10 de la SASV2 a été fait en l'absence de bassin témoin. Le but de cette expérience était de vérifier la possibilité de taux d'incorporation d'OTC satisfaisants sur le terrain, et de tester la résistance au stress d'animaux ainsi traités ; il ne s'agissait pas de statuer sur l'efficacité du traitement par l'OTC d'un bassin. De même, l'expérience, telle qu'elle a été construite sur le site de Seafarm ne permet de comparer que les bassins 9 (témoin) et 10 (traité) ; les bassins 2 et 3 quant à eux diffèrent par la date d'ensemencement en post-larves ainsi que par la densité initiale de celles-ci. Notons, cependant, la grande homogénéité de comportement des bassins 9 et 10 de Seafarm.

L'observation quotidienne de la mortalité dans les bassins au cours de ces élevages a montré une nette réduction de celle-ci pour les animaux traités. Malheureusement, ce recul de la maladie, observé rappelons-le et donc subjectif, se limite aux périodes de traitement (soit 2 fois 10 jours). Ces 20 jours, au total, ne permettent pas aux lots traités de ce démarquer en fin d'élevage.

Les premiers traitements interviennent à partir du 27 Juillet 1994, soit deux mois après ensemencement et après constatation, sur les bords des bassins et en plongée d'inspection, de la présence d'animaux morts. Le phénomène morbide et la mortalité qui l'accompagne étaient donc installés lors du traitement des animaux.

Une partie des raisons du relatif échec du traitement par l'OTC pourraient aussi se trouver dans la quantité tissulaire de la molécule, lieu de son action supposée lors de l'envahissement bactérien. Ces quantités d'OTC tissulaires ne sont pas toujours supérieures en effet aux CMI calculées. Les mesures faites montrent lors du traitement des bassins 2, 3, et 10 des quantités dans le muscle comprises entre 0,22 et 0,54 mg/ml. Ces quantités sont inférieures aux CMI calculées ou citées dans la littérature. Les concentrations d'OTC dans la glande digestive sont cependant supérieures (comprises entre 0,56 et 2,56 mg/ml).

Il apparait donc clairement que les conditions dans lesquelles les traitements ont été réalisés n'ont permis aucun des trois adjectifs : vite, fort et longtemps.

Le traitement des animaux du bassin 10 de la SASV2 permet d'atteindre des concentrations tissulaires en OTC supérieures aux précédentes. Ce résultat est peut-être à mettre en parallèle avec la relative bonne résistance au stress de transfert des animaux traités (cf figure n° 10). Les taux de survie dans les bacs en scobalite sont de 95 et 100% au jour 10 du traitement antibiotique (17 Novembre 1994). Remarquons toutefois que la survie globale de ce bassin est de 24,3 %, et qu'il ne suffit pas de frapper fort de façon ponctuelle.

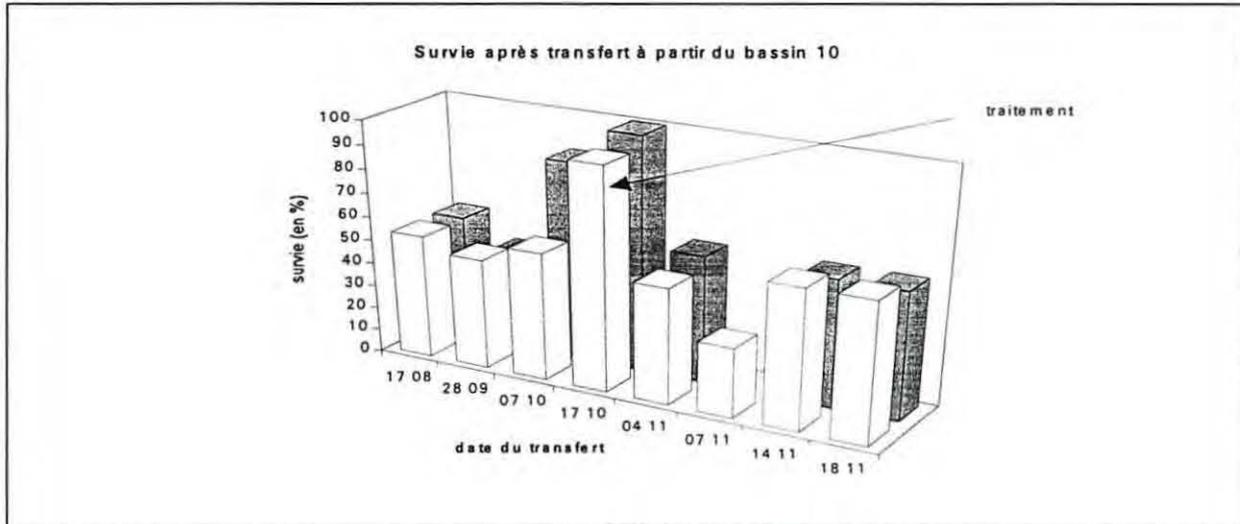


figure n° 10

En conclusion, ces essais montrent la difficulté de mettre en place une antibiothérapie correcte et satisfaisante en pénéculture. Cette démonstration vient s'ajouter à la longue liste des arguments contre l'utilisation des antibiotiques en aquaculture. Quoiqu'il en soit, les résistances des souches AM23 et Z1 conduisent aujourd'hui à éliminer l'OTC de notre maigre arsenal thérapeutique.

5^{ème} partie : perspectives

Nous avons vu que le programme de recherche arrivait au terme d'une première étape dans la démarche diagnostique : un certain nombre d'agents susceptibles de jouer un rôle déterminant dans le syndrome 93 ont été identifiés.

Une première proposition de travail au cours de l'hiver austral 1995 est de réaliser une campagne d'échantillonnage, au cours d'épisodes de mortalité, afin d'établir l'étiologie du syndrome 93.

Les prélèvements réalisés à cette occasion devraient permettre d'établir clairement la ou les lésions associées à ces pics de mortalité.

La collection bactérienne qui sera constituée au cours de ces mêmes prélèvements permettra une étude épidémiologique par type de souches impliquées dans la maladie.

C'est pourquoi, l'accent a été mis dans cette partie, sur la méthodologie des prélèvements proposés. La qualité de ces derniers est le garant d'échantillons pertinents pour les différentes équipes impliquées, et de bonnes observations en histologie, base nécessaire du travail en microscopie électronique.

5-1 : expériences réalisées par les diverses équipes scientifiques impliquées dans le programme

5-1-1 : actions menées par la SASV

1 - Protocole expérimental SASV d'essais de molécules : antibactérien, vaccin et immunostimulant

Les objectifs de ces travaux sont de tenter d'apporter une réponse fiable sur l'efficacité de l'utilisation de spécialités médicamenteuses disponibles sur le territoire de Nouvelle-Calédonie. Si l'utilisation de substances antibiotiques nécessite une ordonnance prescriptive, les éleveurs se voient par contre proposer des spécialités à but vaccinal ou immunostimulant, dont l'efficacité n'a pas été montrée, notamment dans le cadre du Syndrome 93.

L'expérimentation de ces substances ou prémélanges à la station de Saint-Vincent permettra de préciser :

Pour la substance antibiotique : la période de délai d'attente, c'est à dire "le délai à observer entre l'administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal, pour garantir que ces denrées ne contiennent pas de résidus pouvant présenter des dangers pour la santé du consommateur",

La rentabilité économique de l'utilisation de ces substances : le surcoût en achat de produits et en travail peut être justifié par une amélioration de la survie apportant une meilleure rentabilité.

La finalité de ces travaux est donc de proposer aux éleveurs des solutions pratiques, à court terme, permettant de rétablir ou d'améliorer la rentabilité de leurs élevages.

Moyens et impératifs zootechniques :

Les moyens à disposition pour réaliser ces études sont 6 bassins identiques de 1000 m² chacun. Il s'agit des bassins 2 à 7 de la SASV 2 (anciennement ferme Chevallier).

Ces bassins seront ensemencés en début de saison fraîche, sur un schéma semi-intensif (20 PL/m²), de façon simultanée et à partir du même lot de post-larves. Afin de pouvoir interpréter aisément les taux de survie et les indices de conversion finaux, il ne sera réalisé de pêche partielle sur aucun de ces bassins.

Choix de la molécule antibactérienne :

le choix a été orienté par différents éléments : agrément FDA (la FDA a accordé un agrément à trois molécules antibactériennes : la tétracycline (Terramycine®), la sulfamérazine (qui n'est plus disponible sur le marché), et sulfadiméthoxine-ormétoprime (Romet®), les résultats d'antibiogrammes (des antibiogrammes ont été réalisés sur plusieurs souches de *Vibrio* provenant des élevages de crevettes néo-calédoniens (AM23, Z1, NC1, NC2), ces antibiogrammes ont montré que ces souches étaient toutes soit intermédiaires, soit résistantes à l'oxytétracycline, intermédiaires à différentes quinolones (fluméquine, acide nalidixique), ces souches se sont par contre avérées sensibles aux sulfonamides potentialisées.).

Le Romet® : Le Romet® est un prémix contenant une sulfonamide (sulfadiméthoxine) potentialisée (par l'ormétoprime). Son utilisation en aquaculture a surtout concerné les poissons, mais il a également été utilisé en pénéculture en Amérique latine.

Différents traitements envisagés :

Romet® sera à testé selon 3 modalités différentes :

Chaque phase de traitement sera réalisée avec un taux de nutrition de 1%, précédé d'une journée de jeûne, afin de s'assurer une bonne consommation de l'aliment médicamenteux.

Protocole de référence : Il s'agit du protocole de traitement préconisé par le fabricant, à savoir 50 mg de prémix par kg de crevettes par jour pendant 5 jours consécutifs, c'est à dire 5 kg de prémix par tonne d'aliment (calculé à partir du taux de nutrition de 1% justifié ci-dessus).

Protocole de traitement curatif plus lourd : Le granulé sera distribué de la même façon, mais pendant une durée de 10 jours.

Protocole de traitement préventif : Les crevettes seront traitées en aliment médicamenteux à raison de 5 jours toutes les deux semaines à partir d'un poids moyen de 2g.

Vaccin : Le vaccin utilisé sera le vaccin Vibrogène®. Le protocole de vaccination sera le suivant :

- primovaccination par balnéation des post-larves à l'ensemencement
- premier rappel par aliment médicamenteux 4 à 6 semaines après pendant 10 jours
- rappels par aliment médicamenteux pendant 5 jours toutes les 5 semaines.

Immunostimulant : L'immunostimulant utilisé sera le Vitastim, qui contient du bêta-glucan en aliment médicamenteux, à raison de 3,5 kg de prémix par tonne d'aliment, distribué une semaine sur deux.

Suivi pharmacologique :

ce suivi concerne les animaux traités avec la molécule antibiotique, l'eau d'élevage et le sédiment à l'issue de l'assec. Pour l'animal, il convient, d'une part de savoir si les concentrations tissulaires atteintes sont suffisantes pour avoir une activité antibactérienne *in vivo*, d'autre part de vérifier l'absence de résidus à l'issue du temps d'attente. Pour l'environnement d'élevage, il convient de vérifier si la rémanence de la molécule n'est pas trop importante afin de ne pas effectuer de ne pas interférer entre deux cycles d'élevages.

Les dosages seront donc effectués : sur les animaux (à l'issue d'un traitement de chaque protocole, à l'issue du temps séparant deux traitements consécutifs sur chaque protocole, à l'issue du temps d'attente sur un échantillon de chaque bassin), sur le milieu d'élevage (eau à différents moments du cycle d'élevage, sédiments à l'issue du temps d'assec).

Les animaux servant à ces suivis seront prélevés à l'épervier dans les bassins traités. L'analyse porte sur un pool de cinq animaux prélevés dans chaque bassin. Les modalités de prélèvement et d'analyse sont décrites dans l'annexe. Une hémoculture sera réalisée avant et après traitement antibiotique.

Suivi zootechnique :

Estimation de la consommation de l'aliment : cette estimation est particulièrement importante pour apprécier la consommation de la substance médicamenteuse, car un animal malade (en général, une crevette malade en particulier) souffre très fréquemment d'anorexie, ce qui peut rendre la consommation du médicament

insuffisante. Cette estimation sera réalisée grâce à la mise en place de mangeoires permettant la quantification des restes.

Estimation du taux de mortalité : l'estimation des mortalités sera faite grâce à la mise en place de cadres de plongée sur lesquels seront effectuées deux plongées hebdomadaires avec comptage des mortes dans la superficie de ces cadres, ainsi que le comptage des mortes dans les mangeoires.

Traitement des échantillons : les échantillons prélevés en vue du suivi pharmacologique seront traités afin de doser la molécule active par HPLC selon le protocole cité en annexe. Rappelons que l'objet de ces dosages est d'une part de vérifier l'absence de résidus à l'issue du temps d'attente, d'autre part de s'assurer que les concentrations tissulaires atteintes sont suffisantes pour assurer l'activité antibactérienne *in vivo*.

Articulation avec les laboratoires associés : le suivi pharmacologique sera réalisé à l'ORSTOM Nouméa par HPLC. Nous leur fournirons les échantillons prétraités (extraction).

2 - Protocole expérimental SASV de suivi histologique et bactériologique du bassin 10

Il est nécessaire d'acquérir un nombre suffisant d'échantillons de terrain, prélevés avant, pendant et après un épisode de mortalité attribué au Syndrome 93 afin de préciser l'origine et la dynamique des pathogènes identifiés au cours des saisons précédentes. Les échantillons seront des prélèvements en vue d'examens histologiques et bactériologiques, qui seront interprétés en collaboration avec le COP et les autres intervenants du réseau de recherche sur le syndrome 93.

La méthode choisie pour étudier l'évolution temporelle de la maladie est le suivi hebdomadaire d'un bassin "à risques". Il s'agit du bassin 10 de la SASV 2 (anciennement ferme Chevallier), qui a connu de forts taux de mortalité attribués au syndrome 93 au cours de la précédente saison fraîche. Ce bassin est équipé d'une séparation physique en deux parties équivalentes (filet à mailles fines).

Ce bassin seraensemencé en début de saison fraîche, sur le schéma semi-intensif (20 PL/m²) sans assec préalable. Une partie (celle qui sera étudiée) aura un taux de nutrition volontairement excessif (afin d'ajouter un facteur de risque probable), l'autre partie un taux de nutrition normal et servira de témoin sur le plan zootechnique.

Suivi histo et bactério :

Au cours du cycle d'élevage de la saison fraîche, il sera procédé au prélèvement de 30 animaux chaque semaine (le mardi) à partir d'un poids moyen de 2g. Ces animaux seront prélevés à l'épervier dans la moitié suralimentée en trois points du bassin.

En cas de pic de mortalité, un prélèvement supplémentaire sera réalisé, sur des crevettes moribondes.

Chacun des individus est identifié individuellement (et de façon univoque) et les prélèvements seront identiques à ceux réalisés lors d'un pic de mortalité (prélèvement histologique pour moitié en Davidson, pour moitié en Carson et prélèvement bactériologique d'hémolymphe étalée sur gélose ZoBell).

Traitement des échantillons :

l'inclusion en blocs de paraffine et le stockage de ces blocs qui ne seront dans un premier temps étudiés qu'à des "moments clés" du cycle d'élevage : un "point zéro" sera réalisé sur les post-larves à l'ensemencement en réalisant les coupes histologiques (idem pic de mortalité), les échantillons histologiques prélevés autour d'un pic de mortalité seront exploités de la même façon, les échantillons histologiques prélevés hors des pics de mortalité ne seront exploités que plus tardivement, si l'interprétation des résultats nécessite leur exploitation.

Sur chacune des souches bactériennes isolée sera réalisé le portoir type défini en annexe afin de les caractériser vis à vis des critères choisis. Unsouchier "Nouvelle-Calédonie" en congélation à -80°C (Bouillon TSB, NaCl 2%, Glycérol 10%) doit être réalisé. Certaines de ces souches prendront place dans l'étude menée par Pasteur Nouméa.

La SASV intervient d'autre part dans le suivi histologique et bactériologique des pics de mortalité dans les élevages.

5-1-2 : actions menées par le LTDV

1 - Protocole expérimental suivi histologique et bactériologique d'un pic de mortalité dans les élevages

Il est désormais indispensable d'acquérir un nombre suffisant d'échantillons de terrain, prélevés au cours d'épisodes de mortalité attribués au Syndrome 93 afin de vérifier le caractère étiologique des pathogènes identifiés au cours des saisons précédentes dans les fermes de pénéculture de Nouvelle-Calédonie. Ces échantillons seront des prélèvements en vue d'examen histologiques et bactériologiques, ainsi que la congélation à -80°C de crevettes atteintes (dans un but de travail ultérieur, possible, en virologie) qui seront interprétés en collaboration avec les autres intervenants du réseau de recherche sur le syndrome 93. La finalité de ces travaux est d'établir quel(s) est (sont) le(s) agent(s) étiologique(s) responsable(s) de la mortalité observée dans le cadre du Syndrome 93, afin d'établir des outils diagnostiques du (des) agent(s) en cause, et de proposer ultérieurement aux éleveurs des solutions pratiques permettant de rétablir ou d'améliorer la rentabilité de la filière Crevettes en Nouvelle-Calédonie.

Suivi histo et bactério :

Au cours d'au moins 3 pics de mortalité sur plusieurs (à chaque épisode de mortalité) des fermes différentes de Nouvelle-Calédonie (qui seront signalés), il sera procédé au prélèvement de 30 animaux dans le bassin où le pic de mortalité est signalé. Ces animaux (30 pour chaque épisode) seront prélevés à l'épervier en 3 points différents du bassin. Quelques individus moribonds devront être associés à cette étude. Chacun des individus sera identifié individuellement (et de façon univoque) et nous réaliserons :

Un prélèvement bactériologique : une goutte d'hémolymphe étalée sur gélose ZoBell.

Un prélèvement histologique : chaque animal sera fixé pour moitié en Davidson, pour moitié en Carson.

Échantillons destinés aux travaux ultérieurs en virologie :

Au cours des mêmes pics de mortalité attribués au syndrome 93, nous congèlerons quelques crevettes de chaque bassin à -80°C.

Lors d'épisodes de mortalité massive, il est possible de prévoir de fixer un certain nombre d'organes lymphoïdes d'animaux directement en glutaraldéhyde en vue d'éventuels examens ultérieurs en MET, si cela s'avérait justifié.

Traitement des échantillons :

Prélèvements en Davidson : Après 48h de fixation en Davidson, les échantillons sont passés dans l'éthanol 50° et traité pour histologie.

Prélèvements en Carson : Ils sont conservés en Nouvelle-Calédonie, en vue d'une préparation (inclusion Epon) et exploitation éventuelle en microscopie électronique à l'URPIG de la Tremblade, sur la base des résultats des observations en histologie classique.

Prélèvements bactériologiques : Après 24h de culture sur gélose ZoBell, les colonies sont dénombrées, isolées et repiquées en tube de conservation (gélose TSA, 2%NaCl, -80°C) et identifiées.

Articulation avec les laboratoires associés :

les échantillons histologiques sont réalisés (inclusion en blocs de paraffine et coupes histologiques à raison de plusieurs lames par prélèvement). En fonction des résultats de l'histologie, un certain nombre de prélèvements en Carson correspondant à des animaux présentant des lésions intéressantes seront traités (rinçage, fixation et inclusion) puis expédiés à l'URPIG de la Tremblade, accompagnés d'un compte rendu histologique et d'une lame correspondants, pour être traités en microscopie électronique. Ces observations devraient être réalisées en fin de saison froide après avoir constitué une collection d'échantillons pertinente, représentative des épisodes de mortalité liés au syndrome 93.

A l'issue de la saison froide, l'ensemble des souches isolées lors d'accidents pathologiques attribués au Syndrome 93 feront l'objet d'une étude épidémiologique par typage des souches (biotypage, ribotypage ou AP-PCR). De même, cette étude devrait être réalisée en fin de saison froide après avoir constitué une collection bactérienne pertinente, représentative des épisodes de mortalité liés au syndrome 93.

Il est par ailleurs indispensable que l'appellation des animaux et des souches bactériennes ne soit modifiée en aucun cas par les différents intervenants scientifiques du réseau d'étude sur le syndrome 93.

2 - intervention du LTDV en virologie

Compte tenu de l'hypothèse d'une étiologie virale formulée dès le mois de Novembre 1994, il nous est aujourd'hui nécessaire de prévoir un certain nombre d'actions possibles dans ce domaine, notamment des essais de reproduction expérimentale de la maladie, et de purification de l'agent viral, dans un second temps. Il est bien évident, mais cela doit être précisé, que ces actions n'ont lieu d'être qu'après avoir défini et précisé un tableau clinique, lésionnel, du syndrome 93 et établi la correspondance mortalité, anomalies histologiques et modifications ultrastructurales. Le développement d'une voie de travail en virologie, après l'étape de description prévue à l'URPIG (cf ci-dessous), pourrait donc amener à ouvrir de nouvelles collaborations avec les équipes spécialisées du Dr. Bonami (CNRS, Montpellier, France) et du Dr. Lightner (Université AM, Tucson, Texas), dors et déjà préparées par R. Costa.

5-1-3 : actions menées par le COP

1 - Mise au point d'un portoir de bactériologie destiné à la classification des souches de *Vibrio* isolées :

Le but de ce portoir n'est pas une identification *sensu stricto* des souches isolées, mais un rangement en groupe homogènes de celles-ci. La fixation arbitraire de certains paramètres tels la composition ionique des milieux, la température et la durée d'incubation par exemple, rend la lecture des tests invalides pour l'identification. Le principe de base est un devoir de standardisation rigoureuse pour la réalisation des tests.

Ceux-ci sont réalisés uniquement, dans un premier temps, à partir de cultures de 24 heures sur TSA de salinité 2%, et incubés à 26°. Du fait, notamment, du volume probablement important des souches à traiter, mais surtout de l'adéquation des conditions culturales aux germes isolés, la lecture est fixée après une incubation des milieux de 24 heures. Pour la réalisation des milieux, la base commune est l'eau de Lewis. Le pH est de 7,4, sauf cas particuliers (ADH, LDC, ODC).

Après lecture des résultats sur l'ensemble des souches isolées en Nouvelle-Calédonie et disponibles au COP, sur l'ensemble des tests ci-dessous, il sera effectué un premier tri des tests intéressants ou non. Une démarche analogue conduit au choix de la réalisation pratique des tests (tubes ou microplaques). La durée et la température d'incubation pourront également être redéfinies, en fonction de résultats préliminaires.

La réalisation des dendrogrammes est effectuée à l'aide du logiciel Clash, via une prise des données dans Bactus.

Tests effectués : Gram (kit Gram Pasteur), oxydase (disque Pasteur), mobilité (observation au microscope optique d'une culture de 24 heures en TSB, ONPG (β galactosidase), ADH-LDC-ODC, indole, Voges-Proskauer (VP), citrate de Simmons, gélatine, acidification des sucres (Glucose, Saccharose, Mannitol, Sorbitol, Melibiose, Inositol, Ramnhose, Arabinose, Amygdalyne), croissance sur NaCl (concentrations finales de 0, 3, 6, 8 et 10 %). (cf annexe technique).

2 - Etude de la souche AM23

Les premiers résultats de pathologie expérimentale ont montré le caractère particulièrement virulent de la souche de *Vibrio* AM23. C'est pourquoi, une étude plus fine de cette souche est proposée ici : d'une part, étude du support de sa virulence, d'autre part, compte tenu du caractère saisonnier de la mortalité, connaissance du comportement de l'AM23 en diverses conditions culturales.

Etablissement de la courbe de croissance de l'AM23 :

L'AM23 est inoculée dans un milieu de Zobell, ajusté à pH 7,6, incubé à 22°C (Erlen de 200ml) dans une étuve thermostatée sous agitation. La méthode consiste à établir une courbe de croissance par mesure de la densité optique et dénombrements.

Mesure de la densité optique à 550 nm (aliquote de 1 ml sachant qu'il faut au moins 10^7 bactéries/ml pour obtenir une DO mesurable).

Numération des bactéries viables sur milieu de Zobell (aliquote de 1 ml, dilutions successives).

Numération totale en acridine orange au microscope à épifluorescence (aliquote de 1ml).

Les mesures s'effectueront toutes les deux heures pendant un cycle de 24 heures avec un réajustement de la périodicité suivant les résultats.

Evolution de la courbe de croissance en fonction de la température d'incubation :

Températures testées : 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C.

Virulence sur les différentes phases :

Toxines : les prélèvements sont effectués sur des cultures d'ages donnés en fonction de la courbe de croissance. Le milieu utilisé sera un milieu BHI (infusion coeur cerveau) :

- centrifugation
 - filtration à 0.22 μ du surnageant stérilement
 - injection intramusculaire du filtrat
 - passage sur tapis cellulaire (rouge neutre, lyse SDS, DO)
- (un aliquot de chaque surnageant pourra expédié à l'ORSTOM Nouméa.)

Adhésines :

le milieu utilisé sera le BHI, passage de l'AM23 en phase exponentielle sur explant ou sur culture cellulaire (le tapis est constitué sur une lamelle de verre déposée au fond de la cupule de culture), temps de contact de 1 heure puis rinçage au PBS plusieurs fois, colorations MGG, et observation en microscopie optique. Des expériences analogues seront éventuellement menées en vue d'exams en MET.

Mise en évidence d'un état viable mais non cultivable:

- la survie des bactéries avec le temps : culture de l'AM23 en phase exponentielle, numération connue par mesure de do, centrifugation, le culot est récupéré en eau de mer stérile, maintenu agité, à température constante et à l'abri de la lumière. Des dénombrements sont réalisés par mise en culture et épifluorescence, le rapport des résultats est suivi au cours du vieillissement de la suspension.
- cette expérience est renouvelée à diverses températures. Températures testées : 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C.
- la survie des bactéries avec la température : culture de l'AM23 en phase stationnaire, numération connue par mesure de do, centrifugation, le culot est récupéré en eau de mer stérile, maintenu agité. La température de stockage varie entre deux extrêmes (déterminés en fonction des résultats précédents) selon une périodicité donnée (déterminée à partir des données de courbes de croissance). L'évolution du rapport des dénombrements par mise en culture et épifluorescence est suivie au cours de l'expérience.

3 - Influence couplée de l'infection expérimentale et d'une baisse de température sur la survie et l'état physiologique des juvéniles de *Penaeus stylirostris*.

Cette expérience devrait permettre de mettre en évidence l'influence d'une baisse de température sur les mortalités induites par injection intramusculaire de l'AM 23, ainsi que d'estimer la valeur de la capacité osmorégulatrice comme préindicateur d'un pic de mortalité dans les bassins de grossissement de Nouvelle-Calédonie. Nous utiliserons le modèle expérimental mis au point au COP pour ce faire.

On utilisera des triplicats de quinze crevettes de 10 à 15 grammes par traitement, dans 24 bacs de 70 litres, en eau non renouvelée, filtration biologique. A T0, tous les bacs sont maintenus à 27°C. On choisit comme infection expérimentale l'injection intramusculaire de l'AM 23, souche reconnue comme la plus pathogène de celles testées au COP.

Le plan d'expérimentation choisi est le suivant:

Traitement N°	Stress d'injection	Stress température
1	Aucun	Aucun
2	Aucun	oui
3	stérile	Aucun
4	stérile	oui
5	Injection faible dose	Aucun
6	Injection faible dose	oui
7	Injection forte dose	Aucun
8	Injection forte dose	oui

Traitement N°1: Un triplicat témoin ne subissant aucun stress d'injection et restant à 27°C au cours des 24 heures d'expérimentation.

Traitement N°2: Un triplicat témoin ne subissant aucun stress d'injection mais subissant une baisse brutale de température de cinq degrés en moins de 24 heures.

Traitement N°3: Un triplicat témoin subissant un stress d'injection d'eau de mer stérile et restant à 27°C au cours des 24 heures d'expérimentation.

Traitement N°4: Un triplicat témoin subissant un stress d'injection d'eau de mer stérile et une baisse brutale de température de cinq degrés en moins de 24 heures.

Traitement N°5: Un triplicat subissant un stress d'injection de suspension bactérienne à la dose létale 0% maximale précédemment connue et restant à 27°C au cours des 24 heures d'expérimentation.

Traitement N°6: Un triplicat subissant un stress d'injection de suspension bactérienne à la dose létale 0% maximale précédemment connue et une baisse brutale de température de cinq degrés en moins de 24 heures.

Traitement N°7: Un triplicat subissant un stress d'injection de suspension bactérienne à une dose létale comprise entre 0 et 100 % et restant à 27°C au cours des 24 heures d'expérimentation.

Traitement N°8: Un triplicat subissant un stress d'injection de suspension bactérienne à une dose létale comprise entre 0 et 100 % et une baisse brutale de température de cinq degrés en moins de 24 heures.

Il sera effectué un relevé du nombre de morts par bac toutes les deux heures. Au bout des 24 heures, une mesure de la capacité osmorégulatrice sur les individus d'un bac par traitement sera réalisée. Une étude bactériologique et histologique aura lieu pour chaque individu ainsi prélevé, de façon équivalente au suivi effectué sur le bassin 10 de la station de Saint-Vincent en Nouvelle-Calédonie. Les autres bacs seront pêchés et analysés au bout de 48 heures. L'expérience sera renouvelée trois fois, en conservant les mêmes traitements dans les mêmes bacs, ce qui nous permet de ne pas faire de stérilisation entre les expériences, mais simplement de laisser le filtre biologique assainir l'eau pendant la semaine qui suit les 48 heures de manipulation.

L'interprétation de cette expérience nous permettra :

- de savoir si une baisse brutale de température influe sur la capacité osmorégulatrice de l'animal.
- de savoir si la mortalité due à la présence d'une quantité injectée faible de bactéries AM 23 est augmentée suite à une baisse de température.
- d'évaluer la capacité osmorégulatrice comme indicateur d'un stress dû à un envahissement bactérien de l'animal. Ceci peut se révéler utile dans la prédiction des pics de mortalités sur les fermes, notamment dans le but de conduire des traitements pour juguler le phénomène.

5-1-4 : autres intervenants

Institut Pasteur de Paris, Institut Pasteur de Nouméa

A l'issue de la saison froide, l'ensemble des souches isolées lors d'accidents pathologiques attribués au Syndrome 93 pourraient faire l'objet d'une étude épidémiologique par typage des souches (biotypage, ribotypage ou AP-

PCR). Le choix d'un typage moléculaire s'est vu tout à fait justifié dans notre étude préliminaire. La phénotypie lorsqu'il s'agit de germes environnementaux, extrêmement versatiles, ne permet pas le typage fiable des souches isolées. Cette méthode conduit à distinguer des individus (AQ50, code 4063 en API 10E et SF5, code 5142) que les auxanogrammes ou les ribotypes démontrent être identiques ; de plus, chaque individu apparaît différent de lui même, lorsque les tests sont répétés (API 10E).

Une expérience ultérieure était donc envisagée, portant sur un nombre important de souches, isolées lors d'un ou de quelques épisodes de mortalité massive et correspondant à un envahissement significatif des animaux ; parallèlement, un typage des germes présents dans l'eau au cours de ces événements apporterait un complément d'information substantiel.

Le choix du ribotypage comme méthode pour une première étude, outre son intérêt lors d'études analogues (Current Microbiol., 1994, 28 : 97-99), se justifiait par l'utilité d'une identification des souches étudiées (identification permise par la méthode elle-même et l'existence d'une base de données, IPP), ainsi que d'une technique utilisée en routine au laboratoire. L'inconvénient majeur de cette technique - en ce qui nous concerne - est certainement sa lourdeur puisqu'elle nécessite plusieurs étapes, restriction, migration, transfert, hybridation, sa réalisation à distance (Nouméa Paris). Une méthode plus rapide pourrait être envisagée, basée sur le principe de l'amplification génique (Res. Microbiol., 1993, 144 : 373-379, Arch. Pathol. Lab. Med., 1993, 117 : 1088-1098). Les techniques de Random Amplified Polymorphism DNA fingerprinting (RAPD), ou Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) ont en effet été appliquées avec succès à divers études épidémiologiques, notamment dans le genre *Vibrio* (J. Fish Dis., 1994, 17 : 297-302 ; Syst. Appl. Microbiol., 1993, 16 : 303-309, Can. J. Microbiol., 1995, 400 : 446-455).

Il est important de rappeler que cette étude devrait être réalisée en fin de saison froide après avoir constitué une collection bactérienne pertinente, représentative des épisodes de mortalité liés au syndrome 93.

Une convention de travail est à établir entre le GIERA et L'IP de Nouméa afin de définir et préciser les termes possibles d'une collaboration sur cette étude.

ORSTOM Nouméa

Dans le cadre du suivi pharmacologique des essais de traitements des bassins d'élevage, il sera proposé à l'ORSTOM Nouméa de réaliser quelques analyses par méthode HPLC. La SASV fournira les échantillons prétraités (extraction).

Traitement des échantillons : les échantillons prélevés en vue du suivi pharmacologique seront traités afin de doser la molécule active par HPLC. Rappelons que l'objet de ces dosages est d'une part de vérifier l'absence de résidus à l'issue du temps d'attente, d'autre part de s'assurer que les concentrations tissulaires atteintes sont suffisantes pour assurer l'activité antibactérienne *in vivo*.

URPIG IFREMER La Tremblade

Il est évident que ne disposant pas des installations adéquates, le laboratoire de Ronce-les-bains ne pourrait pas entreprendre des travaux de pathologie expérimentale. En fait, le seul domaine dans lequel peut intervenir l'URPIG est la description ultrastructurale d'agents pathogènes.

Cependant, étant donné les programmes développés par l'URPIG concernant la pathologie des Mollusques bivalves marins, il est nécessaire de programmer et de planifier les interventions du laboratoire dans le domaine de la pathologie des pénéides. En effet, il est impossible pour cette unité de faire de la prestation de services vis à vis d'autres laboratoires et en même temps mener à bien ces programmes de recherche propres, retenus jusqu'à présent comme prioritaires.

C'est pourquoi, un nombre restreint d'actions ciblées mais réalisables dans la mesure des moyens humains et matériels disponibles sont ici proposées qui devraient permettre de répondre à des questions particulières.

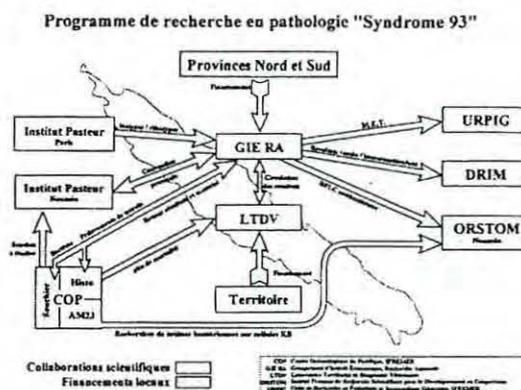
Dans ce cadre, deux actions importantes à mener à bien sont à retenir :

1 - Exploiter de la façon la plus complète, la manipulation stress effectuée en Septembre 1994 à la SASV en Nouvelle-Calédonie. Cela signifie de traiter en microscopie électronique à transmission des échantillons choisis et d'essayer d'associer les images observées en histologie à des modifications ultrastructurales précises (présence d'éventuels agents pathogènes). Cette expérience est très intéressante car elle a permis d'obtenir une mortalité conséquente suite à un stress de transfert et que ce lot d'animaux présente, par ailleurs, des lésions particulières à l'examen histologique. Une association mortalité, lésions histologiques et observations ultrastructurales en MET est le premier pas pour décrire un phénomène particulier, sans préjuger de sa corrélation au syndrome 93. Cependant, il semble nécessaire en pathologie des crevettes péneïdes de faire encore de la description de ce type de phénomène pour accumuler des connaissances de base.

2 - Intervenir pour des analyses ponctuelles en MET lors de pics de mortalité de crevettes en Nouvelle-Calédonie. Cependant pour cette action, il est indispensable de suivre une démarche rigoureuse du fait de l'éloignement entre le lieu de prélèvement et le lieu de de traitement pour la MET. Il est, dans ce cadre, indispensable qu'une histologie de bonne qualité soit faite, car en effet, la MET ne trouve un intérêt réel que lorsqu'il est possible d'associer une anomalie observée en microscopie photonique à une observation ultrastructurale. Le laboratoire de La Tremblade se propose d'obtenir des échantillons ciblés. C'est à dire des échantillons déjà prêts pour la MET (pièces en blocs de résine) pour des animaux contrôlés en histologie classique comme intéressants, accompagnés d'un compte rendu histologique. Un protocole pour aboutir à cela a été proposé, l'essentiel étant de travailler sur des échantillons ciblés pour éviter une perte de temps et d'argent inutiles étant donné les moyens humains et en matériel. Un double des lames histologiques devra être joint aux échantillons MET, ce double est en effet indispensable pour établir la corrélation entre des anomalies repérées en histologie et les observations ultrastructurales.

5-2 : note relative à l'organisation du programme

Le schéma suivant est proposé, qui donne une vision générale de l'organisation du programme, de la répartition des tâches, et de la circulation de l'information. Soulignons l'importance de la réalisation de prélèvements adéquats pour leur traitement ultérieur par des équipes éloignées géographiquement, ainsi que la nécessité d'une circulation ouverte de l'information entre les différentes équipes scientifiques.



Conclusion générale

*I knew six honest service men
(They taught me all I know)
Their names are What and Why and When
And How and Where and Who*

Rudyard Kipling

Malgré l'important volume de travail réalisé jusqu'à présent, dans le cadre de l'étude de la mortalité anormale en grossissement de pénéides en Nouvelle-Calédonie, les questions restent nombreuses et les réponses trop rares. Il est donc difficile de parler de conclusion.

C'est pourquoi, nous reprenons ici un certain nombre de points importants :

- La pénéculture possède, en Nouvelle-Calédonie, un grand nombre d'atouts ; rappelons, succinctement, une disponibilité en eau de bonne qualité pour les activités aquacoles, un nombre important de sites propices à l'installation d'exploitations, une réelle volonté politique de développer cette filière, un marché tourné vers l'exportation, ainsi que la présence sur le Territoire de structures techniques et scientifiques de soutien.

- Cependant depuis 1993, l'accroissement de la production de cette filière a connu une nette réduction et certains sites sont passés au dessous de leur seuil de rentabilité. Le phénomène, dû à des taux de survie anormalement bas, en phase de grossissement, a pris le nom de syndrome 93.

- Le syndrome 93 doit être reconnu comme un phénomène concomittant d'un certain nombre de modifications des conditions de production, qui vont des perturbations météorologiques à l'intensification du système d'élevage. Si l'incidence de ces modifications sur l'apparition du syndrome 93 est certaine, elle reste néanmoins à identifier et à préciser.

- Un rapide tour d'horizon de diverses expériences en matière d'épizooties nous amène à envisager les maladies comme partie intégrante de l'élevage. Cette conception conduit à considérer, en fait, les maladies comme une "sortie" du système d'élevage, dans une approche écopathologique de celui-ci. Cette approche semble être aujourd'hui à privilégier.

- C'est dans cet esprit qu'a été conçu, et mis en place par le GIE/RA Nouméa, un programme de recherche en pathologie des pénéides, afin de répondre aux difficultés de la filière. Ce programme est financé conjointement par le Territoire de la Nouvelle-Calédonie, les Provinces Nord et Sud ; il implique diverses équipes scientifiques.

- Ce programme s'est donné deux objectifs, répondant directement à l'analyse de la situation, et qui sont : le diagnostic de l'agent étiologique du syndrome 93, et, d'autre part, l'identification des conditions favorisant son apparition. Le but de cette démarche est d'établir un plan de lutte basé sur la détection précoce de situations critiques, caractérisées par la présence d'un agent pathogène (diagnostic) et concomitantes à la mise en jeu de facteurs de risques (conditions favorisantes).

- Le second volet de ce programme quitte le domaine *sensu stricto* du pathologiste. Diverses interfaces sont à développer, notamment avec des équipes travaillant dans les domaines de l'environnement (programmes STD3, PRAEC), de la physiologie et de la génétique (équipes COP, valorisation de la souche SPR).

- La partie diagnostique du programme est arrivée au terme de sa première phase : inventaire des agents potentiellement impliqués dans le phénomène morbide. Ces agents sont les suivants : algues cyanophycées, bactéries du genre *Vibrio*, bactéries intracellulaires de type mollicutes, ainsi que des entités ultrafiltrables ayant montré expérimentalement leur pathogénicité.

- Cette première étape étant réalisée, une stratégie d'échantillonnage a été établie avec les divers partenaires impliqués, et proposée pour la saison favorable (hiver austral). L'analyse de ces échantillons devrait permettre de répondre aux questions suivantes :

- 1) Existe-t-il un unique syndrome 93 ?
- 2) Quelle en est la nature, et l'étiologie ?
- 3) Quelle est son incidence sur la production de la filière crevette en Nouvelle-Calédonie ?

- Des protocoles de travail en histologie et en bactériologie sont proposés ici afin de traiter les échantillons collectés et de pouvoir répondre à ces questions.

- Les moyens de lutte contre les maladies des pénéides, et plus généralement des invertébrés marins, sont limités au développement d'outils diagnostiques adaptés, à la gestion des paramètres de milieu lorsque celle-ci est possible, et à la sélection d'animaux génétiquement résistants. Ces différentes voies sont envisagées dans notre étude du syndrome 93.

- Les essais de traitement des animaux par des substances vaccinales, immunostimulantes, ou par des antibiotiques n'ont pas donné de résultats satisfaisants, susceptibles notamment de mettre en balance les inconvénients liés à ces pratiques.

- Ce dernier point nous amène à rappeler les essais "tous azimuts" et les actions intempestives parfois réalisées, soulignant, en fait, le désarroi de la profession face aux phénomènes de mortalité massive. Le syndrome 93 est aujourd'hui autant une maladie de la filière que celle des crevettes.

Ce syndrome 93, à l'instar des « *pharmacôn* », véritables boucs émissaires des cités de la Grèce antique, pourrait bien être, à la fois, la cause de tous les maux mais aussi de leur solution. Au delà de l'analyse du strict point de vue du pathologiste, le syndrome 93 pourrait, en effet, amener à porter un regard neuf sur la filière crevette en Nouvelle-Calédonie. Un certain nombre de propositions ont été faites, émergeant directement de l'analyse de la filière ; rappelons la mise en place, à titre d'exemple, d'une démarche qualité tout au long de la filière, l'établissement de normes zootechniques, véritables amers de l'élevage, ou encore, la proposition d'un label commercial pour le produit fini, garantie d'une qualité extrême, via un cahier des charges rigoureux. Ce regard neuf porté sur la filière constitue très certainement une chance pour celle-ci.

liste des sigles et abréviations

ADN : Acide Desoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARN : Acide Ribonucléique
CFU : Colonie Formant Unité
CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
COP : Centre Océanologique du Pacifique
CSP : Code de la Santé Publique
DAF : Direction de l'Agriculture et de la Forêt
EPA : Environmental Protection Agency
ERPA : Etablissement pour la Régulation des Prix Agricoles
FDA : Food and Drug Administration
GIE RA : Groupement d'Intérêt Economique, Recherche Aquacole
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IHHN : Infectious Hypodermal Hematopoietic Necrosis Virus
LTDV : Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire
MET : Microscopie Electronique à Transmission
ORSTOM : Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération
OTC : oxytétracycline
PBS : tampon phosphate salé
SASV : Station d'Aquaculture de Saint Vincent
TCBS : Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose agar
TSA : Tryptone Soy Agar
UE IPP : Unité des Entérobactéries, Institut Pasteur de Paris
UFP : Université Française du Pacifique
UI : Unités Internationales
URPIG : Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales

Nomenclature des échantillons et prélèvements

AM : Aquamer
AQ : Aquamon
S : Sodacal
SF : Seafarm
SV : Saint Vincent
W : Webuyihoone

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON J.G., NOR SHAMSUDIN M., SHARIFF M., NASH G., 1988. Bacterial septicemia in juvenil tiger shrimp *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fish. Scie.*, 1988, 2 : 93-108.
- ANONYME (a), 1994. Compte rendu de la réunion du 29 Juillet 1994 sur les pathologies crevettes. Fiche de coordination n°94-01.
- ANONYME (b), 1994. Réflexion sur l'utilisation de médicaments en aquaculture. Fiche de coordination n°94-02.
- ANONYME (c), 1994. Schéma général d'organisation de la filière crevettière en Nouvelle-Calédonie. Rapport Mennillo. ERPA, BP 3596, Nouméa, NC.
- AOKI T., KITAO T., KAWANO K., 1981. Changes in drug resistance of *Vibrio anguillarum* in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, in Japan. *J. Fish Dis.*, 4:223-230.
- AQUACOP, CALVAS J., 1989. Aquaculture des crevettes péneïdes tropicales - Etat actuel de la production dans le monde et perspectives de recherche 1989-1993. Rapport interne DRV-89.035-RA/TAHITI.
- AQUACOP, LE MOULLAC G., DAMEZ D., 1992. Modélisation de la résistance aux chocs de salinité. *Aquatic Living Res*, N 4.
- AUSTIN B., 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal marine fishing unit. *Journal of Applied Bacteriology*, 53:253-268.
- AUSTIN B., 1988. *Marine microbiology*. Cambridge University Press. Cambridge. p 222.
- AUSTIN B., AL-ZAHRANI A.M.J., 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairderi* Richardson. *J. Fish Biol.*, 33:1-14.
- AUSTIN B., ALLEN D.A., ZACHARY A., BELAS M.R., COLWELL R.R., 1979. Ecology and taxonomy of bacteria attaching to wood surfaces in a tropical harbor. *Can. J. Microbiol.*, 25: 446-420.
- AUSTIN B., AUSTIN D.A., 1987. *Bacterial fish pathogens*. Ellis Horwood limited publishers. p 364.
- AUSTIN B., BAUDET E., STOBIE M., 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J. Fish Dis.*, 15:55-61.
- AZNAR R., LUDWIG W., AMANN R.I., SCHLEIFFER K.H., 1994. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA targeted oligonucleotide probes. *Int. J. System. Bacteriol.*, 44(2) : 330-337.
- BAROSS J.A., TESTER P.A., MORITA R.Y., 1978. Incidence, microscopy and etiology of exoskeleton lesions in the tanner crab, *Chionoecetes tanneri*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35:1141-1149.
- BATICADOS, M.C.L., LAVILLA-PITOGO, C.R., CRUZ-LACIERDA, E.R., DE LA PEÑA, L.D., SUÑAZ, N.A., 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.*, 9 : 133-139.
- BAUMANN L., BAUMANN P., MANDEL M. & ALLEN R.D., 1972. Taxonomy of aerobic marine bacteria. *Journal of Bacteriology* 110:402-429.
- BAUMANN R.G.H., JAMANDRE D., 1990. A practical method for determining quality of *Penaeus monodon* (Fabricius) fry for stocking in growout ponds, in M.B. New, H. de Saram et T.Singh (éd). *Proceedings of the*

Aquatech Conference on. Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming. Publ. Infofish, Kuala Lumpur, Malaisia.

BAYBAY L., 1989. The effect of temperature and salinity on *Penaeus monodon* postlarvae with observations on commercial hatchery techniques in relation to post-larval quality. Master Thesis, Asian Institute of technology, Bangkok, Thailand.

BELL, T. A., 1992. Drugs and chemotherapeutants for shrimp diseases : their present status in the United States, with an overview of research and approval processes. In Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Proceedings of a workshop in Honolulu, Hawaii, April 27-30 1992, p. 311. The Oceanic Institute publishers. 392 pp.

BERLAND B.R., BONIN D.J., MAESTRINI S.Y., 1972. Are some bacteria toxic for marine algae ?. Mar. Biol., 12:189-193.

BERNOTH E.M., 1991. Possible hazards due to fish drugs. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 11(1):17-21.

BERTHE F., 1994. Effets des antibiotiques à concentrations subinhibitrices chez les crevettes pénéides : une hypothèse sur leur mode d'action en élevage larvaire. Recueil de Médecine Vétérinaire - Spécial Méd. Vét. et biologie marine, 170 2/3), 167-170.

BERTHE, F., 1994. Rapport de mission en Métropole du 16 Novembre au 08 Décembre 1994. Rapport GIE/RA.

BERTRAND J.C., LARSEN H., 1989. La "bactérie marine" : mythe ou réalité. in Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. BIANCHI M., MARTY D., BERTRAND J.C., CAUMETTE P., GAUTHIER M. et collaborateurs. Masson Edts.

BEVERIDGE M.C.M., SIKDAR P.K., FRERICHS G.N., MILLAR S., 1991. The ingestion of bacteria in suspension by the common carp *Cyprinus carpio* L.. J. of Fish Biol., 39:825-831.

BIANCHI M., MARTY D., BERTRAND J.C., CAUMETTE P., GAUTHIER M. et collaborateurs, 1989. Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. MASSON Edts.

BITTERLICH G., SCHABER E., 1986. Bacteria - food or competitors of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* Val.? J. Fish Biol., 29:605-612.

BJÖRKLUND H.V., BONDESTAM J., BYLUND G., 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. Aquaculture, 86 : 359-367.

BJÖRKLUND H.V., RÅBERGH C.M.I., BYLUND G., 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. Aquaculture, 97 : 85-96.

BOUARICHA N., 1990. Ontogénèse de l'osmorégulation chez la crevette *Penaeus japonicus*. Thèse de doctorat de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc.176pp.

BOYLE P.J., MITCHELL R., 1978. Absence of microorganisms in crustaceans digestive tracts. Science, 200:1157-1159.

BRIGGS M., BROXN J.A., 1991, Intensive rearing of postlarval *Penaeus monodon* in a concrete nursery tank system. 22nd Ann, Meeting of the World Aquaculture Society, San Juan, Puerto Rico.

BROCK J.A., LEAMASTER B., 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. in Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming.Ed. : The World Aquaculture Society pp. 212-226

BROWN J.H., HIGUERA-CIAPARA I, 1992. Antibiotic residues in farmed shrimp - a developing problem ? In : Chemotherapy in Aquaculture : from theory to reality. Office International des Epizooties, Symposium, Paris, 12-15 March 1991. p. 521.

CASTILLE F.L., LAWRENCE A.L., 1979. The role of bacteria in the uptake of hexoses from seawater by postlarval penaeid shrimp. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 64A(1):41-48.

CHARMENTIER G., 1986. Variations des capacités osmorégulatrices au cours du développement post-embryonnaire de *Penaeus japonicus* Bate, 1888 (Crustacea Decapoda). *C.R. Acad. Sci. Paris*, t.303, Série III, N6, 217-222.

CHARMENTIER G., CHARMENTIER-Daures M., Bouaricha N., THUET P., ALKEN D.E., TRILLES J.P., 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans : *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*, *Biol. Bull*, 175 : 102-110.

CLIFFORD H.C., 1992. Marine shrimp pond management : a review, Wyban, J. editor. Proceedings of the special session on shrimp farming World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA, 111-137.

COLEMAN D.E., NAKAGAWA L.K., NAKAMURA R.M., CHANG E., 1980. The effect of antibiotics on hatching of *Artemia* cysts: in: PERSOONE G., SORGeloos P., ROELS O., JASPERS E. (Editors), *The Brine Shrimp Artemia*. vol 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Universa Press, Wetteren (Belgium), pp. 153-157.

COLWELL R.R., LISTON J., 1962. The natural bacterial flora of certain marine invertebrates. *J. Insect. Pathol.*, 4:23-33.

COOK T.M., GOLDMAN C.K., 1976. Bacteriology of Chesapeake bay surface waters. *Chesapeake Science*, 17(1):40-49.

DE KINKELIN P., MICHEL C., 1992. The use of drugs in aquaculture. *Infofish International* 4/92.

DEBERNARDI J.-M., 1992. Influence de l'antibiothérapie en pisciculture de marais maritimes sur l'environnement conchylicole (application à l'oxytétracycline). Thèse doctorat vétérinaire. Nantes. 146 pp.

DEMPSEY A.C., KITTING C.L., 1987. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana*, 52(1):90-94.

DEMPSEY A.C., KITTING C.L., ROSSON R.A., 1989. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana*, 56(3):267-278.

DESNOTTES J.F., 1993. Effets des antibiotiques à concentrations subinhibitrices : de nouveaux mécanismes d'action pour des indications nouvelles. *Rev. Prat. (Paris)*, 43(7) : 864-867.

DIXON, B. A., 1994. Antibiotic Resistance of bacterial fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1) : 60-63.

DROUIN DE BOUVILLE R de, 1907. Les maladies des poissons d'eau douce d'Europe. *Annales des Sciences Agronomiques*, 1:120-250.

EFFENDI I., AUSTIN B., 1991. Survival of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in sea water. *FEMS Microbiology Letters*, 84:103-106.

EGIDIUS E., ANDERSEN K., HOFF K.A., HJELTNES B., 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36(4):518-520.

ENGER, Ø., B.HUSEVÅG & J.GOKSØYR, 1991. Seasonal variation in presence of *Vibrio salmonicida* and total bacterial counts in norwegian fish farm water. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(8):618-623.

EUTICK, M.L., R.W. O'BRIEN & M. SLAYTOR, 1978. Bacteria from the gut of Australian termites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:823-832.

FEGAN D.F., 1992. Recent developments and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. Wybar, J, editor. Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA, 55-70.

FISHER W.S., ROSEMARK T.R., NILSON E.H., 1976. The susceptibility of cultured american lobsters to a chitinolytic bacterium. World Mariculture Society, pp. 511-520.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F., KONGSON S., VUTHIKOMNDOMKIT S., SRIURAITANA S., BOONYARATPALIN S., CHANTANACHOOKHIN C., VICKERS J.E., Mc DONALD O.D., 1992. Occurrence diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. Workshop Proceedings, Honolulu 1992, 57-112

FOUZ B., CONCHAS R.F., BOLINCHES J., ROMALDE J.L., BARJA J.L., TORANZO A.E., 1990. Relationship among pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio tubiashii* with environmental Vibrios. In Pathology in Marine Science, PERKINS F.O., CHENG T.C., Academic Press.

FRELIER, P., 1994. Recommandations pour la gestion sanitaire des élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie. Rapport de mission, ERPA.

FRELIER P., LOY J.K., LAWRENCE A.L., BRAY W.A., BRUMBAUGH G.W. 1994. Status of necrotizing hepatopancreatitis in Texas farmed shrimp, *Penaeus vannamei*. In World Aquaculture 94. January 14-18 1994, New Orleans. p 123.

GATESOUBE F.J., 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. Aquaculture, 89:139-148.

GATESOUBE F.J., 1991. Elevage larvaire du turbot: les probiotiques à la rescousse. Aqua Revue, 38:25-28.

GILMOUR A., 1977. Characteristics of marine Vibrios isolated from fish farm tanks. Aquaculture, 11:51-62.

GOEBBELS, J.H.G., 1992. Residues problems with regard to cultivated fish. In : Chemotherapy in Aquaculture : from theory to reality. Office International des Epizooties, Symposium, Paris, 12-15 March 1991. p. 521.

GOLTEN C., SCHEFFERS W.A., 1975. Marine Vibrios isolated from water along the dutch coast. Netherlands Journal of Sea Research, 9(3-4):351-364.

GUNTHER D.C., CATENA A., 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. In: G.PERSOONE, P.SORGELOOS, O.ROELS and E.JASPERS (Editors), The Brine Shrimp *Artemia*. Vol 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Universa Press, Wetteren (Belgium), pp. 213-221.

HANSEN G.H., STROM E., OLAFSEN J.A., 1992. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. Appl. Environ. Microbiol., 58(2):461-470.

HJELTNES B., ANDERSEN K., EGIDIUS E., 1987. Multiple antibiotic resistance in *Vibrio salmonicida*. Bull. Eur. Ass. fish Pathol., 7(4):85.

HOOD M.A., MEYERS S.P., COLMER A.R., 1971. Bacteria of the digestive tract of the white shrimp, *Penaeus setiferus*. Bacteriological Proceedings, 71:G 147.

HUNGATE R.E., 1975. The rumen microbial ecosystem. Ann. Rev. Ecol. Syst., 6:39-66.

JACOBSEN, P., BERGLIND, L., 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. Aquaculture, 70 : 365-370.

JANDA J.M., POWERS C., BRYANT R.G., ABBOTT S.L., 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clin. Microbiol. Rev., 1(3) : 245-267.

- JIRAVANICHPAISAL P., MIYAZAKI T., LIMSUWAN C., 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health, 1994, 6 : 27-35.
- KAPER J.B., LOCKMAN H., REMMERS E.F., KRISTENSEN K., COLWELL R.R., 1983. Numerical taxonomy of vibrios isolated from estuarine environments. International Journal of systematic Bacteriology, 33:229-255.
- KIRCHMAN D.L., DUCKLOW H.W., 1987. Trophic dynamics of particle-bound bacteria in pelagic ecosystems: a review. p 54-82. in D.J.W.Moriarty and D.S.V.Pullin (Eds) Detritus and microbial ecology in aquaculture. ICLARM Conference Proceedings 14,420p. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.
- KITA-TSUKAMOTO K., OYAIKU H., 1993. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae determined on the basis of 16S rRNA sequences. Int. J. System. Bacteriol, 43(1) : 8-19.
- KOBAYASHI T., ENOMOTO R., SAKAZAKI R., KUWAHARA S., 1963. A new selective isolation medium for pathogenic Vibrios: TCBS agar. Jap. J. Bacteriol., 58:387-391.
- KOGURE K., SIMIDU U., TAGA N., 1979. Effect of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve on the growth of marine bacteria. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 36:201-215.
- KOLENBRANDER P.E., 1991. Coaggregation: adherence in the human oral microbial ecosystem. in Microbial cell-cell interaction (M.Dworkin Edt) American Society for Microbiology, Washington, DC20005.
- KRISTENSEN K.K., 1971. The occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the sound. ord. Vet. Med., 36:188-195.
- KROL R.M., HAWKINS W.E., OVERSTREET R.M., 1991. Rickettsial and mollicutes infections in hepatopancreatic cells of cultured pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). J. Invert. Pathol., 1990, 57 : 362-370.
- LEE J.S., PFEIFFER D.K., 1976. Microbiological characteristics of Pacific shrimp (*Pandalus jordani*). Appl. Environ. Microbiol., 33:853-859.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., 1994. Histopathology, histochemistry and ultrastructural studies of Taura Syndrome, a putative toxicity syndrome of penaeid shrimp. In Worl Aquaculture 94. January 14-18 1994, New Orleans. p 227.
- LIGHTNER D.V., 1988. IHVN Virus disease of Penaeid shrimp in Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Developments in aquaculture in fisheries science, Vol. 17. (Ed. : Sindermann, C.J. and Lighthner, D.V.) Elsevier (1988) pp. 11-15
- LIGHTNER D.V., 1988. *Vibrio* disease of Penaeid shrimp in Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Developments in aquaculture in fisheries science, Vol. 17. (Ed. : Sindermann, C.J. and Lighthner, D.V.) Elsevier (1988) pp. 42-47
- LIGHTNER D.V., 1992. Shrimp Virus Diseases : Diagnosis, Distribution and Management in Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming.(1992) Ed. : The World Aquaculture Society pp. 238-253
- MacDONELL M.T., COLWELL R.R., 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new Genera, *Listonella* and *Shewanella*. Syst. Appl. Microbiol., 6:171-182.
- MAUGLE P , 1988. Post-larvae (sic) shrimp mortality study. Artemia Newsletter 8, Publ.Artemia Ref. Centre, Ghent, Belgique.
- McBEE R.H., 1971. Significance of intestinal microflora in herbivory. Ann. Rev. Ecol. Systematics, 2:165-176.

- McPHEARSON R.M., DePAOLA A., ZYWNO S.R., MOTES M.L., GUARINO A.M., 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99:203-211.
- MOHNEY L.L., LIGHTNER D.V., BELL T.A., 1994. Vibriosis in ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea, Decapoda). *J. World Aquac. Soc.*, 1994, 25(1), 115-125.
- MORISHITA H., SANO T., KAMIYA N., OKUDA M., 1978. Growth stimulating substances for *Vibrio alginolyticus* contained in *Chlorella* extract. *Bull. Jap. Soc. Scie. Fish.*, 44(6):665-671.
- MUROGA K., HIGASHI M., KEITOKU H., 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65:79-88.
- NIETES A.D., 1990. The effect of feed types/forms on the growth and quality of *Penaeus monodon* postlarvae. Masters Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.
- NIETO T.P., TORANZO A.E., BARJA J.L., 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerlings rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north-west of Spain. *Aquaculture*, 42:193-206.
- OWENS L., HALL-MENDELIN S., 1989. Recent advances in Australian prawns diseases and pathology. *Advances in Tropical Aquaculture, Tahiti 20.02/04.03 1989. AQUACOP IFREMER. Actes de colloque 9 pp103-112.*
- PAGNOCCA F.C., MENDOCA HAGLER L.C., HAGLER A.N., 1991. Heterotrophic bacteria associated with the shrimp *Penaeus schmitti*, sediment and water of Sepetiba bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Microbiol., Sao Paulo*, 22(3):247-252.
- PATRICK F.M., 1978. The use of membrane filtration and marine agar 2216E to enumerate marine heterotrophic bacteria. *Aquaculture*, 13:369-372.
- PFISTER R.M., BURKHOLDER P.R., 1965. Numerical taxonomy of some bacteria isolated from antarctic and tropical seawater. *J. Bacteriol.*, 90: 863-872.
- RICHMOND, M.H., 1972. Some environmental consequences of the use of antibiotics or "what goes up must come down". *Journal of Applied Bacteriology*, 35:155-176.
- RIEGER M., 1978. Bacteria as food for marine Harpacticoid Copepods. *Marine Biology*, 45:337-345.
- ROBERTS R.J., 1978. *Fish pathology*. Bailliere Tindall. London. p 318.
- ROSENBERRY R., 1994. *World shrimp farming 1994*. Shrimp News International, December 1994. SNI publisher, San Diego, USA. 68 pp.
- RUIMY R., BREITTMAYER V., ELBAZE P., LAFAY B., BOUSSEMART O., GAUTHIER M., CHRISTEN R., 1994. Phylogenetic analysis and assesment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small subunit rRNA sequences. *Int. J. System. Bacteriol*, 44(3) : 416-426.
- SAMOCHA T.M., LAWRENCE A.L., 1992. Shrimp nursery systems and management. Wyban, J. editor. *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA. 87-105.
- SAMUELSEN, O.B., 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture* 83 : 7-16.
- SCHULTZ J.E., BREZNAK J.A., 1978. Heterotrophic bacteria present in the hindguts of wood eating termites (*Reticulitermes flavipes* (Kollar)). *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:750-759.

SHOTTS E.B., BULLOCK G.L., 1975. Bacterial diseases of fishes: diagnostic procedures for Gram-negative pathogens. J. Fish. Res. Board Can., 32(8):1243-1247.

SUGITA H., DEGUCHI Y., 1983. Media for the isolation of aerobic and facultatively anaerobic bacteria in freshwater environments. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(11):1737-1740.

SUGITA H., MIYAJIMA C., DEGUCHI Y., 1991. The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture, 92:267-276.

TACKAERT W., ABELIN P., DHERT P., LEGERE P., BOMBEO R., SORGELOOS P., 1989. Stress resistance in postlarval penaeid shrimp reared under different feed procedures. Pres. Aquaculture'89, Los Angeles, USA, 12-14 Feb.

TAKAHASHI Y., ITAMI T., NAKAGAWA A., NISHIMURA H., ABE T., 1985. Therapeutic effect of oxytetracycline trial tablet against vibriosis in kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate. Bull. Jap. Soc. Scien. Fish., 51(10) : 1639-1643.

UKELES R., BISHOP J., 1975. Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria. J. Phycology, 11(2):142-149.

VERON M., 1966. Taxonomie numérique des vibrions et de certaines bactéries comparables. Ann. Inst. Pasteur, III : 671-709.

VANDERZANT C., NICKELSON R., JUDKINS P.W., 1971. Microbial flora of pond reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Appl. Microbiol., 21(5):916-921.

VILLALON J.R., 1991. Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp. TAMU-SG-91-501. TAMU Sea Grant College Programm, College Station, Texas, 104 pp.

WEPPE M., BONAMI J.R., LIGHTNER D.V. y Aquacop, 1993. Demostración de altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN in Memorias I Congreso Ecuatoriano de acuicultura, (1992) Ed. : Escuela Superior Politecnica del Litoral, 1993 pp. 229-232.

WEST P.A., BRAYTON P.R., BRYANT T.N., COLWELL R.R., 1986. Numerical taxonomy of Vibrios isolated from aquatic environments. Int. J. Syst. Bacteriol., 36(4):531-543.

WYLIE, J.L., D.J. CURRIE, 1991. The relative importance of bacteria and algae as food sources for crustacean zooplankton. Limnology and Oceanography, 36(4):708-728.

WOOD E. J. F., 1952. Heterotrophic bacteria in marine environments of eastern Australia. Austr. J. Mar. Fish. Res., 4(1) : 160-200.

YASUDA K., KITAO T., 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture, 19:229-234.

ZOBELL C.E., 1941. Studies on marine bacteria.I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J. Mar. Res., 4(1): 42-75.

Glossaire des termes employés

adhésine : substance présente à la surface d'un microorganisme et qui permet son adhésion aux surfaces, spécialement à celles de son hôte.

amorce (primer) : courte séquence de DNA ou de RNA complémentaire du début d'une matrice servant de point de départ à son recopiage par une polymérase.

amplification en chaine par polymérase (PCR) : procédé d'amplification exponentielle in vitro d'une séquence définie d'ADN, faisant intervenir des cycles successifs d'appariements d'oligonucléotides spécifiques et d'élongation à l'aide d'une polymérase.

anthropisé : se dit d'un milieu fortement marqué par l'action de l'homme.

auxanogramme : profil caractérisant, pour une bactérie donnée, l'ensemble des composés organiques, sources de carbone, pouvant être utilisés comme source d'énergie exclusive pour la croissance de cette bactérie.

biocénose : ensemble d'êtres vivants en équilibre biologique, les effectifs de chaque espèce restant constants dans le temps.

blotting : voir transfert.

caryorrexix : fragmentation du noyau dont les débris se répandent dans le cytoplasme de la cellule.

choc osmotique : action de soumettre les organismes à un milieu fortement hypertonique.

choc thermique : brusque variation de température, généralement supérieure à 5°C mais dont l'appréciation varie avec les espèces considérées.

coefficient de transformation (ou indice de consommation) : rapport du poids d'aliment ingéré au gain de poids obtenu.

complexe pathologique : ensemble de troubles sanitaires liés entre eux et/ou liés à un stade physiologique particulier.

contamination horizontale : l'agent pathogène issu d'un malade ou d'un porteur asymptomatique aboutit à l'hôte réceptif par contact direct ou action d'un vecteur animé ou inanimé.

contamination verticale : l'agent pathogène est transmis par les gamètes.

ecopathologie : discipline épidémiologique qui est consacrée à l'étude des relations entre les facteurs de l'environnement et la pathologie d'élevage. L'écopathologie est une branche de l'épidémiologie analytique.

enquête : méthode d'étude consistant en l'accumulation d'informations en situation réelle. Selon le mode de collecte de l'information, on distingue plusieurs types d'enquête : dans les enquêtes prospectives, au fur et à mesure de leur apparition dans la population suivie ; dans les enquêtes retrospectives, a posteriori en faisant appel à la mémoire des enquêtés.

enzootique : caractère d'une maladie animale présente en permanence dans un espace géographique donné.

enzyme de restriction : endonucléase bactérienne clivant spécifiquement les deux brins du DNA au niveau d'une séquence parfaitement définie.

epizootique : caractère d'une maladie animale qui atteint brusquement et de façon plus ou moins éphémère un grand nombre d'animaux à un moment donné.

eutrophisation : enrichissement des eaux en matière organique.

facteur de risque : paramètre dont la présence augmente la probabilité d'apparition d'une maladie et sur lequel l'homme peut intervenir.

hématopoïèse : formation des constituants du sang ou de la lymphe.

immunoprophylaxie : méthode de prévention des maladies transmissibles induisant chez l'animal une résistance immunitaire spécifique, synonyme : vaccination.

immunoprotection : protection mettant en jeu des mécanismes immunitaires.

indicateur : indice biologique permettant d'informer sur le statut d'un individu ou d'une population.

léta : mortel - Dose Létale 50 : concentration d'un produit provoquant la mort de 50% des individus qui y sont soumis.

marqueur de risque : paramètre sur lequel l'homme n'a pas d'influence et dont la présence augmente la probabilité d'apparition d'une maladie ou d'un trouble de la santé (âge, climat...).

marqueur de virulence : propriété identifiable par une technique de laboratoire chez un bioagresseur et qui signe sa virulence sans avoir besoin de faire appel à la maladie expérimentale.

matières en suspension : particules de tailles variables qui flottent dans l'eau et peuvent être mises en évidence par centrifugation ou filtration ; elles sont en partie responsables de la turbidité.

microbisme : paramètre de l'environnement définissant l'état et l'importance de la population microbienne dans un milieu donné.

monoclonaux : anticorps très spécifiques produits par des lignées de cellules hybrides appelées hybridomes. Un anticorps monoclonal provient d'un clone ayant à l'origine une cellule unique et l'immunoglobuline produite est dirigée contre un seul déterminant antigénique.

osmorégulation : mécanismes permettant le maintien de l'équilibre hydrominéral des animaux quaternaires au cours des changements de salinité de l'eau.

pathognomonique : se dit des symptômes spécifiques d'une maladie et dont la constatation permet de porter un diagnostic sans aucune ambiguïté.

pathologie de groupe : maladie affectant des lots d'animaux de façon plus ou moins permanente dans des systèmes d'élevages donnés et associés à des pertes économiques (baisse de performances) mais sans gravité clinique (mortalité).

pathologie multifactorielle : maladies ou troubles de la santé dont l'étiologie est complexe et où interviennent plusieurs facteurs de risque.

phénotype : manifestation apparente de la constitution du génome sous la forme d'un trait morphologique, d'une variation qualitative ou quantitative du produit final d'expression d'un gène.

pili : fines projections portées par la paroi de certaines bactéries.

plasmide : fragment de DNA extra-chromosomique circulaire présent dans les bactéries, susceptible de se répliquer de façon autonome. Ils peuvent porter des gènes de résistance aux antibiotiques transférables par conjugaison.

poïkilothermie : fait pour la température d'un organisme, de suivre les variations de la température ambiante.

primer : voir amorce.

processus morbide : filière selon laquelle une cause de maladie produit les lésions observées ; désigne souvent l'état de maladie.

pycnose : lésion cellulaire caractérisée par une rétractation du noyau qui devient hypercolorable par les colorants basiques (basophilie).

receptivité : sensibilité à une cause de maladie.

séquençage : détermination de l'ordre linéaire des composants d'une macromolécule.

sonde : séquence d'acide nucléique, d'au moins 15 nucléotides, homologue à une séquence de DNA ou de RNA, avec laquelle elle s'hybride de façon spécifique par réassociation entre bases complémentaires.

spectrophotomètre : appareil de titrage par mesure des densités optiques des solutions, à différentes longueurs d'ondes.

stress : ensemble des réactions survenant chez un animal placé dans une situation d'inconfort.

transfert : (blotting) transfert de macromolécules (acides nucléiques ou protéines) d'un gel vers une membrane où elles se fixent.

turbidité : propriété de l'eau se traduisant par une réduction de sa transparence, due à la présence de matières en suspension, de substances colloïdales ou de plancton.

vacuolisation : formation de cavités dans une cellule et, par extension, au sein d'une matière quelconque.

vide sanitaire : élimination de tous les animaux et désinfection dans un lieu de production : devrait se pratiquer entre le départ d'un lot parvenu à la qualité commerciale et l'arrivée d'un nouveau lot à produire.

zoonose : maladie qui se transmet naturellement des animaux à l'homme.

Annexes

Annexe 1

Appendices techniques au programme de recherche en pathologie.

Appendice I-2-1 : identification des espèces bactériennes impliquées

- les souches bactériennes de la collection correspondent à des prélèvements d'hémolymphe, de glandes digestives, à partir d'animaux en grossissement ou de géniteurs, de broyats de larves en éclosion, de prélèvements d'eau ou de sédiments. Ces prélèvements sont réalisés sur différents sites, lors d'épisodes de mortalité ou en dehors de tout contexte pathologique.

- les prélèvements sont mis en culture sur milieux gélosés : Marine Agar (2216 E de ZoBell), TCBS (et Hektoen en ce qui concerne les prélèvements d'eau). Chaque colonie macroscopiquement différente est isolée et mise en culture pure sur milieu TSA à 2% de NaCl. La collection de souches est conservée dans un milieu à 10% de glycérol à -80°C.

- chaque souche est caractérisée au niveau du genre selon les tests suivants : coloration de Gram, morphologie, mobilité, oxydase, voie d'attaque du glucose sur milieu MEVAG, type respiratoire sur gélose VF, croissance et coloration sur TCBS, luminescence sur MA.

- dans une deuxième étape, les germes de la famille des *Vibrionaceae* seront étudiés sur la base d'un grand nombre de caractères phénotypiques : auxanogrammes sur 99 sources de carbone, comportement vis-à-vis du NaCl sur gamme de concentrations en eau peptonée. Les résultats de ces tests seront mis en place sous forme de matrice et traités en taxonomie numérique, classification hiérarchique ascendante (logiciel clash). Les résultats des auxanogrammes seront traités par un logiciel d'identification (logiciel reconnaître).

- les modoformes des taxons individualisés par ces méthodes font l'objet d'une identification génomique sur la base de leurs profils de restriction des gènes codant pour les rRNA. Ces résultats sont vérifiés par hybridation quantitative ADN-ADN avec des souches de référence.

Appendice I-2-2 : caractérisation phénotypique des souches pathogènes

- le ou les taxons correspondant aux souches impliquées dans le processus pathogène sont caractérisés par les tests d'identification de genre.

- un portoir est élaboré sur la base de caractéristiques biochimiques de ce ou ces taxons ; il s'agit de tests de type b-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, citrate ou autre à déterminer en fonction des données du point I-2-1 ; les conditions de réalisation de ces tests sont à adapter, si nécessaire, aux souches marines.

- le portoir mis au point est validé en aveugle sur un échantillon de souches issues de la collection, et de souches de références (collection confiée au LTDV).

- ce portoir est utilisé par le laboratoire de diagnostic en vue de l'identification des souches bactériennes isolées en élevage de crevettes.

Appendice I-2-3 : développement d'outils nouveaux

- compte tenu des inconvénients inhérents aux points I-2-1 et I-2-2, à savoir lourdeur pour le premier et manque de spécificité pour le second, il apparaît judicieux d'envisager le développement d'outils nouveaux, dans l'éventualité, notamment, d'études épidémiologiques ou écologiques des souches pathogènes.

- un antigène total bactérien est préparé à partir des souches pures sélectionnées et identifiées, en culture sur TSA 2% NaCl en période de croissance logarithmique. La préparation de l'antigène comprend des centrifugations, rinçages en tampon PBS, traitement dénaturant et remise en suspension en tampon PBS à d.o. établie. Des lapins sont sensibilisés à cet antigène et fournissent un anti sérum. Après titrage des sérums obtenus, ceux-ci sont testés par agglutination rapide sur lame. Ce type de test peut être utilisé par une unité diagnostique ; la qualité des serum obtenu peut conduire après purification par la méthode de Wolfson à une conjugaison à la fluoresceine et utilisation par examen direct en microscopie optique après marquage de coupes histologiques.

- les profils plasmidiques constituent un outil intéressant dans la mesure où ceux-ci peuvent être le support de facteurs de virulence. Les ADN sont extraits selon la méthode classique (non spécifique de l'ADN plasmidique) utilisant la lyse bactérienne et des traitements au phénol-chloroforme, précipitations à l'éthanol ; cependant, l'utilisation de kits commerciaux d'extraction de plasmides, "qiagen" par exemple, peut être envisagée. La séparation est faite par électrophorèse en gel d'agarose et révélée au bromure d'éthidium (BET) sur table UV.

- une technique dérivée de l'amplification génique a été utilisée avec succès dans l'étude épidémiologique de *Vibrio spp.*, la Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). Sur la base de ces résultats, quelques amorces pourraient être utilisées sur une partie de notre collection d'ADN précédemment constituée. Ce travail comporte le choix et la synthèse d'une dizaine d'amorces (environ 10 mer), amplification génique en conditions non stringentes, électrophorèse en gel d'agarose révélée au BET et analyse des profils obtenus (utilisation éventuelle de logiciels type Restricto-Scan, Restricto-Typer) par un indice de Dice.

Appendice I-3-1 : reproduction expérimentale de la maladie

- ces essais ont pour but de reproduire et de modéliser la pathologie observée dans les élevages de Nouvelle Calédonie. L'hypothèse bactérienne apparaît aujourd'hui comme la plus vraisemblable et sera donc privilégiée. Les tests proposés reposent sur le principe de l'inoculation de bactéries supposées pathogènes à des animaux de l'espèce *P. stylirostris* supposés indemnes de toute pathologie. Une souche importée de Nouvelle Calédonie en Polynésie Française en 1993 et une souche tahitienne de la même espèce sont testées vis-à-vis de l'infection bactérienne provoquée.

- l'injection par voie intramusculaire et intragastrique permettent d'obtenir une réponse fiable en matière de mortalité et de calculer pour chaque souche testée la Dose Léthale 50. Ce type de test permet de vérifier le caractère pathogène d'une souche et de sélectionner les souches pathogènes en vue de leur étude ultérieure (cf points précédents et suivants).

- l'utilisation de voies d'inoculation différentes est à envisager ; notamment, contamination alimentaire, ou balnéation. Ces voies doivent permettre de reproduire la maladie, et les lésions qui l'accompagnent généralement. Ce modèle présente un intérêt fondamental dans la compréhension et la maîtrise de la pathogénie. L'étude de ce modèle sera complétée d'une étude histologique des animaux en cours d'expérimentation selon le protocole de fixation multiple (Davidson, Carson, glutaraldéhyde) évoqué et décrit au point I-1-3.

- des surnageants de cultures bactériennes, des lysats bactériens sont utilisés selon le même protocole et permettent de rechercher des toxines bactériennes, endo ou exo toxines.

Appendice I-3-2 : étude *in vitro* de facteurs de virulence

- la caractérisation du pouvoir pathogène des bactéries en cause est complétée par une étude *in vitro*, c'est à dire sur lignée cellulaire. Différentes lignées sont utilisées, poissons, mollusques, arthropodes, y compris des cellules de crevettes en culture. Les capacités d'adhésivité des bactéries sont testées sur tapis confluent, après un délai de contact entre suspension bactérienne de densité ajustée et tapis cellulaire, et rinçages au PBS. L'analyse des relations entre les bactéries et les cellules est fait en microscopie optique après coloration de type Giemsa (ou

MGG), en épifluorescence ou en microscopie électronique à transmission. Les échantillons destinés à être traités en MET sont préparés comme il a été décrit précédemment.

- l'activité cytotoxique de surnageants de cultures bactériennes ainsi que de lysats bactériens est testée de même sur cultures de cellules. les modifications du tapis cellulaire en plaque P 96 sont examinées. Notamment, la survie des cellules est révélée par l'incorporation de rouge neutre par celles-ci, élimination du milieu de culture et lecture en densité optique du tapis après lyse des cellules au SDS. L'examen en MET du tapis cellulaire est envisagé.

Appendice I-4-1 : sélection de molécules actives

- la sélection de molécules actives n'est possible dans l'état actuel des choses que pour les antibiotiques. Des antibiogrammes sont réalisés sur les souches isolées en élevage selon la méthode qualitative dite de Heatley sur milieu gélosé de Mueller Hinton. La réponse est donnée par le diamètre d'inhibition de croissance des bactéries.

- cette méthode permet dans des conditions rigoureuses de réalisation d'évaluer la concentration minimale inhibitrice des antibiotiques testés pour les bactéries mises en culture.

- cette approche est complétée par la culture de bactéries en microplaque, P 96 ; le milieu de culture est alors une eau de mer stérile peptonée à 15 g/l. Pour chaque souche, on réalise une gamme de puits contenant le milieu de culture additionné de concentrations données de l'antibiotique testé. Le résultat est donné par la croissance bactérienne dans un puit après 24 heures d'incubation, évaluée éventuellement par un lecteur microplaques en double longueur d'onde.

Appendice I-4-2 : application du modèle expérimental

- les molécules sélectionnées sur leurs propriétés antibactériennes sont utilisées pour le traitement d'animaux destinés à subir des essais de reproduction expérimentale de la maladie tels qu'ils sont conçus et décrits au point I-3-1 ; deux volets sont envisagés, à savoir, traitement suivi de challenge, traitement en cours de challenge.

- des animaux ayant été traités avec des molécules présentées comme des vaccins ou immunostimulants, subissent un traitement analogue. La résistance de ces animaux aux tests d'inoculation de pathogène est comparée à celle d'animaux de la même espèce, ni malades ni traités, soumis aux mêmes tests.

Appendice I-4-3 : essais terrain de molécules

- ces essais constituent un complément aux points I-4-1 et I-4-2 ; les molécules présentant des propriétés avérées à titre préventif ou curatif sont utilisées expérimentalement dans des bassins d'élevage. Chaque élevage traité doit faire état d'un élevage comparable appelé témoin. L'efficacité d'un traitement est évaluée en termes de résultats zootechniques. Des tests de résistance au stress sont appliqués aux animaux issus de ces élevages. Ces stress consistent en des transferts en bassins scobalite après capture à l'épervier, transferts en conditions défavorables de température, salinité etc...

- ce dispositif ne permettant pas ou prou d'avoir un nombre de réplicats suffisant, une technique d'élevage en cage ou en enclos est mise au point afin de constituer des lots d'individus au sein même d'un bassin. L'utilisation de cet outil permet de comparer des lots d'animaux traités différemment dans des conditions supposées identiques par ailleurs. L'analyse des résultats d'élevage est similaire à la précédente.

- ces élevages font l'objet d'un suivi particulier en matière de pathologie tel qu'il est prévu aux points I-1-2 et 3.

- le contrôle doit être fait que les molécules utilisées ne laissent aucun résidu tel qu'il est prévu par la loi ; ce contrôle, notamment dans la chair des animaux destinés à la consommation, est fait par technique HPLC. Cette analyse est réalisée sur des pools d'animaux, muscle et hépatopancréas, après extraction de la molécule recherchée selon un protocole adapté à la nature de celle-ci.

- au cours de ces essais de traitement, il est prévu de prélever des échantillons d'hémolymphes qui seront congelés à -80°C en vue de leur utilisation ultérieure. Cette utilisation sur la base d'électrophorèses permettra de corréler les résultats des essais à la caractérisation de ces hémolymphes d'un point de vue biochimique. Les années sur le système immuns de nos animaux ne nous permettent pas de construire aujourd'hui un protocole plus précis.

Appendice II-1-1 : enquête rétrospective

- une enquête rétrospective sur tous les grossissements en bassins terre lancés après 1991,

- une enquête rétrospective sur tous les prégrossissements réalisés à SODACAL depuis l'origine sera réalisée. SODACAL est la seule ferme du Territoire pratiquant ce type d'élevage qui, plus courts que le grossissement classique (2 à 3 mois au lieu de 7 à 8 mois), semblent toutefois être le siège des mêmes pathologies.

L'enquête tachera de mettre en évidence l'influence des pratiques culturales (taux de nutrition notamment) sur la survie globale de l'élevage, l'apparition de mortalités et la mortalité post-transfert.

Annexe 2

Données expérimentales relatives à l'OTC : matériel et méthodes

- matériel et méthodes :

sensibilité des souches de Vibrio spp. isolées à l'OTC

Les souches bactériennes correspondent à des prélèvements d'hémolymphe, ou de glandes digestives, à partir d'animaux en grossissement (mesures de prévalence), de broyats de larves en éclosion, de prélèvements d'eau ou de sédiments. Ces prélèvements sont réalisés sur différents sites, lors d'épisodes de mortalité ou en dehors de tout contexte pathologique. Les prélèvements sont mis en culture sur milieux gélosés : Marine Agar (2216 E de ZoBell), TCBS. Un dénombrement des colonies (CFU) sur gélose est réalisé.

Chaque colonie macroscopiquement différente est isolée et mise en culture pure sur milieu TSA à 2% de NaCl. Des antibiogrammes sont réalisés sur les souches isolées en élevage selon la méthode qualitative dite de Heatley sur milieu gélosé de Mueller Hinton. La réponse est donnée par le diamètre d'inhibition de croissance des bactéries autour d'un disque de papier buvard imprégné de l'antibiotique testé (disques à 30 UI d'OTC). Les souches bactériennes sont donc caractérisées en souches résistantes (R), intermédiaires (I), ou sensibles (S). Cette méthode permet dans des conditions rigoureuses de réalisation d'évaluer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des antibiotiques testés pour les bactéries mises en culture.

Pour cette étude cependant, la mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice est faite par incorporation de 1 ml de solutions à doses croissantes d'OTC, à une gélose Mueller Hinton resalée (2%). Les boîtes de Petri ainsi préparées sont ensemencées par inondation avec 0,05 ml d'une suspension bactérienne étalonnée (0,5 McFarland) d'une souche pure en eau salée à 2% NaCl. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

contrôle de l'incorporation de la molécule dans un aliment médicamenteux

L'oxytétracycline incorporée aux granulés est sous forme de chlorhydrate, à la concentration théorique de 3 à 5 mg/g de granulé en fonction des auteurs (soit donc 3 à 5 kg par tonne d'aliment). Cet aliment est préparé par la société SICA-NC. L'index Merck (édition IX) indique que le meilleur solvant de cette forme du produit est l'eau : 1 g/ml (la solubilité dans l'éthanol n'est pas excellente, 12 mg/ml dans l'éthanol absolu). Le solvant d'extraction à température ambiante choisi est donc l'eau distillée et la méthode de dosage la spectrophotométrie (Beckman spectrophotomètre UV-visible M-26). Les granulés sont réduits en poudre fine ; 1 g d'aliment témoin et de l'un des lots contenant de l'antibiotique sont extraits par 100 ml d'eau distillée (fiolle jaugée, agitation magnétique, 1 heure). La suspension est filtrée et les mesures sont effectuées. Les mesures sont faites à la longueur d'onde de 378 nm, longueur d'onde choisie en raison de la netteté du maximum d'absorption à cette longueur d'onde (le spectre est enregistré en présence de soude qui conduit à la formation de phénate avec effets hyperchrome et bathochrome). Une gamme étalon est constituée à partir de solutions d'antibiotique sous forme de phénate, des mesures sont faites après incorporation de quantités connues d'antibiotique à l'aliment témoin, incorporation de quantités connues d'antibiotique à l'extrait d'aliment témoin, puis réalisées sur extraits d'aliments à doser.

La "tenue à l'eau" de l'aliment préparé pour le traitement des animaux est évaluée par dosage de l'OTC libérée dans l'eau où séjourne des granulés ; 10 g de granulés sont stockés en étamine dans un volume de 10 litres d'eau de mer à température ambiante et en conditions naturelles d'éclairage, l'expérience est menée en trois exemplaires, les mesures en HPLC (cf ci-dessous) sont faites pour les prélèvements correspondant à un séjour dans l'eau de 30, 60 et 120 minutes.

consommation de l'aliment médicamenteux

La prise d'aliment est évaluée pour un ensemble d'animaux et non individuellement. La consommation globale de l'aliment médicamenteux est évaluée au travers des restes sur le fond des bassins ou des mangeoires installées dans ceux-ci.

Les dosages d'oxytétracycline sont réalisés à partir de prélèvements d'animaux. Les animaux destinés aux mesures sont groupés en lot de 5 individus et congelés en vue d'un traitement différé ; les mesures sont faites sur le muscle et la glande digestive. Ces organes sont prélevés par dissection et pesés de sorte à obtenir 1 g d'organe par groupe d'animaux. Les échantillons sont dilués au 1/10 en tampon PBS, broyés au stomacher (Lab-Blender, Seward medical BA 6020) pendant 5 mn, puis ultraphonés 5 mn (Vibra cell, Sonics VC 40). Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 mn à 5.600 Tr/mn puis filtrés à 0,45 μ (Millec-HA). Des prélèvements de sol et d'eau au cours de ces traitements ont été faits afin de pouvoir mesurer les quantités d'OTC dans ces compartiments des bassins. Les échantillons d'eau de mer sont filtrés à 0,45 μ . Les échantillons sont conservés à - 20 °C, jusqu'au dosage ; les mesures sur ces échantillons ne sont pas encore disponibles.

La méthode HPLC, utilisée est celle décrite par Samuelsen (1989), légèrement modifiée. Elle utilise une chromatographie en phase inverse, justifiée par le caractère relativement polaire de la molécule d'OTC. Le chromatographe est équipé d'une colonne Waters μ -bondapack, (30 cm x 3 mm, avec une pre-colonne Waters μ -bondapack) ; le solvant est de l'acide oxalique 0,01 M et méthanol 1:0,5 à un débit de 1,5 ml/mn. Le volume d'échantillon injecté est de 20 μ l. Le temps de rétention de l'OTC dans ces conditions est de 4,8 mn environ ; il est détecté à la longueur d'onde de $\lambda=350$ nm. La limite de détection de l'appareil est de 0,1 mg/ml.

essais de traitement des animaux

Quatre lots d'animaux, en bassin de grossissement, ont subi un traitement à l'OTC : ils'agit des bassins 2, 3 et 10 de la ferme Seafarm, les taux de survies de ces lots sont comparés à ceux du bassin 9, non traité et élevé dans des conditions égales par ailleurs. De même un essai de traitement a été réalisé sur le bassin 10 de la SASV.

Le traitement est appliqué conformément aux recommandations de divers auteurs pendant une période de 10 jours, suivie éventuellement d'une nouvelle période de 10 jours à quelques semaines d'intervalle. Un temps d'attente de 21 jours (trois semaines) est recommandé avant abattage des animaux destinés à la consommation humaine.

La résistance des animaux à un stress est envisagée comme critère d'évaluation de santé. Ce test intervient dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité du traitement des animaux par l'OTC. Les animaux sont capturés à l'épervier dans le bassin d'élevage puis transférés par lots d'environ 20 individus en bassin de scobalite (unité expérimentale) où l'eau est continuellement renouvelée et aérée. Les animaux sont nourris de façon fractionnée. Les observations sont faites régulièrement dans les jours qui suivent le transfert et les animaux morts sont relevés. Le stress correspond à la sommation de la capture, transfert, eau claire, nature du fond, etc...il s'agit d'un stress complexe. Le test est conduit pendant une semaine avant sacrifice des animaux survivants.

D'autre part, une évaluation de la bactériémie des animaux est permise par la mise en culture d'une goutte d'hémolymphe sur milieu gélosé (cf mesures de prévalence, plus haut).

Une mortalité excessive en période de grossissement se traduit par un nombre important de cadavres d'animaux sur le fond des bassins et sur les berges ; ce phénomène a donné le nom de Seagull Syndrome (SGS) en raison des oiseaux adaptés à une nourriture facile. En l'absence de méthodes de dénombrement ou d'évaluation satisfaisantes, l'observation de la mortalité se fait sur la base du nombre de cadavres comptés sur le bord des bassins (observation quotidienne) ou sur le fond de ceux-ci (lors des plongées d'inspection). En unité expérimentale, les cadavres sont relevés une à plusieurs fois par jours, selon les expériences.

Annexe 3

Tests recommandés dans le cadre de l'étude des souches de *Vibrio spp.* isolées en Nouvelle-Calédonie

Gram : (kit Gram Pasteur)

Oxydase : (disque Pasteur)

Mobilité : Observation au microscope optique d'une culture de 24 heures en TSB.

ONPG (β galactosidase)

A partir d'une culture sur milieu de Kligler (ou de tout autre milieu contenant du lactose), effectuer une suspension épaisse dans un tube contenant 0,5 ml d'eau de Lewis tamponnée et un disque ONPG (Pasteur).

Lecture : (1 heure)

Jaune (même très faible): +

Incolore : -

ADH-LDC-ODC

Milieu de base :

Extrait de levure..... 3 g

Glucose 1 g

Bromocrésol pourpre (1,6 g / 100 ml alcool 95°) 1 ml

Eau de Lewis..... 1 l

pH : 6,4

Ajouter :

ADH (L-arginine monochlorhydrate)..... 5 g

LDC (L-lysine monochlorhydrate)..... 5 g

ODC (L-ornithine monochlorhydrate)..... 5 g

Utilisation :

A partir d'une suspension en eau de Lewis, ensemercer les trois tubes, plus un témoin (milieu de base seul).

Lecture (valide uniquement si le tube témoin est jaune) :

violet : +

jaune : -

Indole

Milieu :

Peptone (indole free)..... 15 g

Eau de Lewis..... 1 l

Réactif (Kovacs): kit Pasteur

Utilisation :

Sur une culture de 24 heures dans le milieu de base, ajouter une goutte de réactif.

Lecture :

Anneau rouge : +

Anneau jaune ou incolore : -

Voges-Proskauer (VP)

Milieu VP-RM Difco réhydraté à l'eau de Lewis

Réactifs (Barritt): kit Pasteur

Utilisation :

Sur une culture de 24 heures, ajouter une goutte du réactif 1 et du réactif 2.

Lecture :

Virage au rouge : +

Aucune réaction : -

Citrate de Simmons

Milieu :

Magnésium sulfate 0,2 g

Sodium citrate 2 g

Ammonium phosphate 0,2 g

Sodium ammonium phosphate..... 0,8 g

Bleu de bromothymol 0,08 g

Eau de Lewis..... 1 l

Lecture :

Virage au bleu ou croissance : +

Pas de réactions : -

Gélatine :

Languettes de film (Pasteur)

Utilisation :

Faire une suspension épaisse dans 0,5 ml d'eau de Lewis tamponnée, déposer une languette de film sans l'immerger totalement. Incuber.

Lecture :

Virage au noir : +

Pas de changement : -

Acidification des sucres

Milieu de base :

Peptone de caséine 5 g

Peptone de viande 5 g

Rouge de phénol 0,018 g

Eau de Lewis..... 1 l

Ajouter les sucres suivant pour obtenir une concentration finale de 1 % :

Glucose, Saccharose, Mannitol, Sorbitol, Melibiose, Inositol, Ramnhose, Arabinose, Amygdalyne

Utilisation :

Ensemencer avec une suspension bactérienne en eau de Lewis.

Lecture :

Virage au jaune : +

Rouge : -

Croissance sur NaCl :

Milieu de base :

Peptone 15 g

Eau distillée..... 1 l

Ajouter du NaCl pour arrivée à des concentrations finales de 0, 3, 6, 8 et 10 %

Lecture après 24 heures d'incubation :

Croissance : +

Pas de croissance : -